



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA  
Facultad de Ciencias  
Dpto. de Biología Vegetal

Tesis Doctoral

Embriogénesis somática de olivo (*Olea europaea* L.) a  
largo plazo: Crioconservación de embriones somáticos  
y análisis de la estabilidad genética

Fatiha Bradaï

Málaga, 2015



Publicaciones y  
Divulgación Científica

AUTOR: Fatiha Bradaï

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización  
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer  
obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de  
Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)



Departamento de Biología Vegetal  
Área de Fisiología Vegetal

DÑA. CAROLINA SÁNCHEZ ROMERO PROFESORA DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL DE LA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA,

CERTIFICA que la memoria de Tesis titulada “Embriogénesis somática de olivo (*Olea europaea* L.) a largo plazo: Crioconservación de embriones somáticos y análisis de la estabilidad genética” presentada por Dña. Fatiha Bradaï para optar al grado de Doctora ha sido realizada bajo su dirección y autoriza su presentación para su defensa en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga.

Málaga, Noviembre de 2014

Fdo. Carolina Sánchez-Romero



## ÍNDICE



<b>ÍNDICE</b>	i
<b>ABREVIATURAS</b>	xi
<b>RESUMEN/SUMMARY</b>	xiii
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	1
I.1. Botánica y taxonomía.....	3
I.2. Origen y distribución geográfica.....	4
I.3. Importancia económica.....	5
I.4. Mejora genética.....	5
I.5. Aplicación de herramientas biotecnológicas en la mejora.....	7
I.6. Métodos de regeneración.....	9
I.7. Crioconservación de ES de olivo.....	10
I.8. Estabilidad genética.....	11
<b>OBJETIVOS.....</b>	13
<b>CAPÍTULO II. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA A LARGO PLAZO.....</b>	17
II.1. Introducción.....	19
II.1.1. Fases del proceso de embriogénesis somática.....	19
II.1.1.1. Inicio de cultivos embriogénicos.....	19
II.1.1.2. Proliferación de cultivos embriogénicos.....	19
II.1.1.3. Desarrollo y maduración de ES.....	20
II.1.1.4. Germinación de ES.....	21
II.1.2. Embriogénesis somática en olivo.....	21
II.1.2.1. Inicio de cultivos embriogénicos .....	21
II.1.2.2. Proliferación de cultivos embriogénicos.....	22
II.1.2.3. Desarrollo y maduración de ES.....	22
II.1.2.4. Germinación de ES.....	23

II.1.3. Efecto del tiempo de cultivo sobre el proceso de embriogénesis somática	23
II.2. Material y métodos.....	25
II.2.1. Material vegetal.....	25
II.2.2. Medios de cultivo.....	25
II.2.3. Condiciones ambientales.....	27
II.2.4. Inicio de cultivos embriogénicos.....	27
II.2.5. Proliferación de cultivos embriogénicos.....	27
II.2.6. Desarrollo y maduración de ES.....	28
II.2.7. Germinación de ES.....	28
II.2.8. Potencial de regeneración.....	29
II.2.9. Multiplicación de brotes.....	29
II.2.10. Enraizamiento de brotes.....	29
II.2.11. Aclimatación.....	29
II.2.12. Análisis estadístico.....	30
II.3. Resultados.....	31
II.3.1. Proliferación de cultivos embriogénicos.....	31
II.3.2. Desarrollo y maduración de ES.....	34
II.3.3. Germinación de ES.....	36
II.3.4. Potencial de regeneración.....	38
II.3.5. Multiplicación de brotes.....	41
II.3.6. Enraizamiento de brotes.....	43
II.3.7. Aclimatación.....	44
II.4. Discusión.....	46
II.4.1. Proliferación de cultivos embriogénicos.....	46
II.4.2. Desarrollo y maduración de ES.....	47



II.4.3. Germinación de ES.....	49
II.4.4. Potencial de regeneración.....	50
II.4.5. Multiplicación de brotes.....	50
II.4.6. Enraizamiento de brotes.....	50
II.4.7. Aclimatación.....	51
<b>CAPÍTULO III. CRIOCONSERVACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS.....</b>	<b>53</b>
III.1. Introducción.....	55
III.1.1. Técnicas de crioconservación.....	55
III.1.1.1. Técnicas clásicas.....	55
III.1.1.2. Técnicas basadas en la vitrificación.....	56
III.1.2. Protocolos de crioconservación basados en la vitrificación.....	60
III.1.3. Crioconservación de cultivos embriogénicos de olivo.....	62
III.2. Material y métodos.....	64
III.2.1. Material vegetal.....	64
III.2.2. Protocolo de crioconservación.....	64
III.2.3. Efecto del tiempo en PVS2.....	64
III.2.4. Efecto del tipo de explanto utilizado en la crioconservación.....	65
III.2.5. Efecto del método de cultivo y de la fase de crecimiento de los cultivos.....	65
III.2.6. Efecto de la crioconservación sobre el proceso de embriogénesis somática.....	66
III.2.7. Aplicabilidad del método de crioconservación a distintas líneas embriogénicas.....	66
III.2.8. Efecto de un precultivo a corto plazo con distintas concentraciones de sacarosa en medio sólido y líquido.....	66
III.2.9. Efecto de un precultivo a largo plazo en medio sólido con distintas concentraciones de sacarosa.....	66

III.2.10. Efecto de un precultivo a largo plazo en medio líquido con distintas concentraciones de sacarosa.....	67
III.2.11. Influencia de la crioconservación y de un pretratamiento con sacarosa sobre la embriogénesis somática.....	67
III.2.12. Efecto de un pretratamiento con sacarosa sobre la aplicabilidad del método de crioconservación a distintas líneas embriogénicas.....	67
III.2.13. Toma de datos.....	68
III.2.14. Tinción con FDA.....	68
III.2.15. Análisis estadístico.....	67
III.3. Resultados.....	70
III.3.1. Efecto del tiempo en PVS2.....	70
III.3.2. Efecto del tipo de explanto utilizado en la crioconservación.....	73
III.3.3. Efecto del método de cultivo y de la fase de crecimiento de los cultivos.....	76
III.3.4. Efecto de la crioconservación sobre el proceso de embriogénesis somática.....	79
III.3.5. Aplicabilidad del método de crioconservación a distintas líneas embriogénica.....	85
III.3.6. Efecto de un precultivo a corto plazo con distintas concentraciones de sacarosa en medio sólido y líquido.....	88
III.3.7. Efecto de un precultivo a largo plazo en medio sólido con distintas concentraciones de sacarosa.....	93
III.3.8. Efecto de un precultivo a largo plazo en medio líquido con distintas concentraciones de sacarosa.....	95
III.3.9. Influencia de la crioconservación y de un pretratamiento con sacarosa sobre la embriogénesis somática.....	99
III.3.10. Efecto de un pretratamiento con sacarosa sobre la aplicabilidad del método de crioconservación a distintas líneas embriogénicas.....	103
III.4. Discusión.....	106
III.4.1. Efecto del tiempo en PVS2.....	106
III.4.2. Efecto del tipo de explanto utilizado en la crioconservación.....	107

III.4.3. Efecto del método de cultivo y de la fase de crecimiento de los cultivos.....	108
III.4.4. Efecto de la crioconservación sobre la embriogénesis somática y aplicabilidad a distintas líneas embriogénicas.....	109
III.4.5. Efecto de un precultivo a corto plazo con distintas concentraciones de sacarosa en medio sólido y líquido.....	111
III.4.6. Efecto de un precultivo a largo plazo en medio sólido con distintas concentraciones de sacarosa.....	112
III.4.7. Efecto de un precultivo a largo plazo en medio líquido con distintas concentraciones de sacarosa.....	113
III.4.8. Influencia de la crioconservación y de un pretratamiento con sacarosa sobre la embriogénesis somática y aplicabilidad del método a distintas líneas embriogénicas.....	113
<b>CAPÍTULO IV. ESTABILIDAD GENÉTICA.....</b>	<b>117</b>
IV.1. Introducción.....	119
IV.1.1. Factores que inducen variación somaclonal.....	119
IV.1.1.1. Tipo de explanto.....	119
IV.1.1.2. Genotipo.....	120
IV.1.1.3. Medio de cultivo.....	120
IV.1.1.4. Tiempo de cultivo.....	120
IV.1.2. Mecanismos de la variación somaclonal.....	121
IV.1.2.1. Mutaciones cromosómicas.....	121
IV.1.2.2. Mutaciones génicas.....	122
IV.1.2.3. Sobrecruzamiento somático.....	122
IV.1.2.4. Amplificación del ADN.....	122
IV.1.2.5. Transposones.....	123
IV.1.2.6. Variación epigenética.....	123
IV.1.3. Técnicas de evaluación de la estabilidad genética.....	124
IV.1.3.1. Análisis morfológico.....	124

IV.1.3.2. Análisis citológico.....	124
IV.1.3.3. Análisis genético.....	125
IV.1.4. Variación somaclonal debida al proceso de embriogénesis somática.....	127
IV.1.5. Variación somaclonal debida al proceso de crioconservación.....	128
IV.2. Material y métodos.....	129
IV.2.1. Evaluación de la estabilidad genética de plantas regeneradas vía embriogénesis somática.....	129
IV.2.1.1. Material vegetal.....	129
IV.2.1.2. Análisis fenotípico.....	129
IV.2.1.3. Análisis con marcadores moleculares .....	130
IV.2.2. Evaluación de la estabilidad genética de plantas crioconservadas.....	132
IV.2.2.1. Material vegetal.....	132
IV.2.2.2. Análisis fenotípico.....	132
IV.2.2.3. Análisis con marcadores moleculares.....	133
IV.3. Resultados.....	134
IV.3.1. Evaluación de la estabilidad genética de plantas regeneradas vía embriogénesis somática.....	134
IV.3.1.1. Análisis fenotípico.....	134
IV.3.1.2. Análisis con marcadores moleculares .....	145
IV.3.2. Evaluación de la estabilidad genética de plantas crioconservadas.....	151
IV.3.2.1. Análisis fenotípico.....	151
IV.3.2.2. Análisis con marcadores moleculares.....	154
IV. 4. Discusión.....	158
IV.4.1. Evaluación de la estabilidad genética de plantas regeneradas vía embriogénesis somática.....	158
IV.4.1.1. Análisis fenotípico.....	158
IV.4.1.2. Análisis con marcadores moleculares.....	160

IV.4.2. Evaluación de la estabilidad genética de plantas crioconservadas.....	161
IV.4.2.1. Análisis fenotípico.....	161
IV.4.2.2. Análisis con marcadores moleculares.....	162
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>165</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>169</b>









**ABREVIATURAS**

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2iP	6-γ-γ-(dimetilalilamino)purina
ABA	Ácido abscísico
AFLPs	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
ANA	Ácido naftalenacético
ANOVA	Análisis de la varianza
BAP	6-bencilaminopurina
DARTs	<i>Diversity Array Technology</i>
DKW	Medio de Driver y Kuniyuki para nogal (Driver y Kuniyuki 1984)
DMS	Diferencia mínima significativa
DMSO	Dimetil sulfóxido
ECO	Medio de embriogénesis cíclica de olivo (Pérez-Barranco <i>et al.</i> 2009)
ECO <sup>-</sup>	Medio ECO sin reguladores de crecimiento ni cefotaxima
ES	Embrión(es) somático(s)
ESBO < 5 mm	Embriones somáticos blanco-opacos inferiores a 5 mm
ESBO ≥ 5 mm	Embriones somáticos blanco-opacos iguales o superiores a 5 mm
ESTr < 5 mm	Embriones somáticos translúcidos inferiores a 5 mm
ESTr ≥ 5 mm	Embriones somáticos translúcidos iguales o superiores a 5 mm
ESTs	<i>Expressed sequence tags</i>
EZ	Embrión(es) zigótico(s)
FDA	Fluoresceína diacetato
IBA	Ácido indol-3-butírico
IRAPs	<i>Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism</i>
LEA	Abundantes en la embriogénesis tardía

LS	Solución de carga
MS	Medio de Murashige y Skoog (1962)
MP	Material de proliferación
NL	Nitrógeno líquido
OM	Medio de olivo (Rugini 1984)
OMc	Medio de olivo modificado (Cañas y Benbadis 1988)
OMe	Medio de olivo para elongación de raíces (Cañas y Benbadis 1988)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEM	Masa proembriogénica
PVS	<i>Plant Vitrification Solution</i>
QTLs	<i>Quantitative Trait Loci</i>
RAPDs	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
REMAPs	<i>Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism</i>
RFLPs	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SCARs	<i>Sequence Characterized Amplified Region</i>
SSRs	<i>Simple Sequence Repeats</i>
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
UPGMA	<i>Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean</i>
TTC	Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolium

## RESUMEN

El olivo (*Olea europaea* L.) constituye uno de los cultivos más antiguos y de mayor relevancia de la cuenca mediterránea, tanto por su importancia económica como por su papel medioambiental. La importancia del olivo justifica el desarrollo de programas de mejora con el fin de resolver algunos de los problemas que limitan la producción de este cultivo. Sin embargo, características tales como su elevado nivel de heterocigosis, bajo nivel de cuajado de fruto, dificultades en la germinación de las semillas o largo periodo juvenil, retrasan de forma importante la obtención de cultivares superiores a través de métodos clásicos de mejora. Esto hace que la mejora dependa en gran medida de la Biología Molecular y la Biotecnología.

La aplicación de herramientas biotecnológicas requiere la disponibilidad de un protocolo de regeneración eficiente que permita la obtención de plantas a partir de una sola célula. Al igual que en otras especies leñosas, la embriogénesis somática es el método de regeneración normalmente utilizado en olivo.

Cuando se utilizan en programas de mejora, los cultivos embriogénicos deben ser mantenidos durante periodos prolongados de tiempo, mientras se llevan a cabo los ensayos biotecnológicos y los análisis en campo. Sin embargo, el mantenimiento *in vitro* a largo plazo de cultivos embriogénicos conlleva una serie de inconvenientes tales como el riesgo de pérdida del material por contaminación o error humano, la pérdida del potencial embriogénico o la aparición de variación somaclonal. La crioconservación se considera el único método efectivo y seguro para la conservación a largo plazo de germoplasma vegetal.

El objetivo general de esta Tesis ha sido estudiar la aplicabilidad en programas de mejora genética de olivo de la embriogénesis somática a largo plazo y la crioconservación.

En una primera fase se evaluó el efecto del mantenimiento a largo plazo de cultivos embriogénicos sobre la eficiencia de la embriogénesis somática y el establecimiento *ex vitro* de las plantas regeneradas. Para ello se utilizaron diez líneas embriogénicas distintas mantenidas mediante subcultivos repetitivos durante dos y ocho años. Independientemente del efecto del genotipo, que en algunas fases de la embriogénesis somática tuvo una influencia determinante, los resultados obtenidos pusieron de manifiesto un aumento de la tasa de proliferación con la edad de los cultivos así como una alteración del patrón de proliferación, presentando las líneas antiguas un crecimiento más rápido y desorganizado. En las fases de maduración y germinación se observó una disminución de la eficiencia que tuvo como consecuencia un descenso significativo del potencial de regeneración. Aunque en las líneas antiguas se obtuvo un mayor número de brotes por embrión somático germinado, estos fueron significativamente más cortos. Las plántulas obtenidas no presentaron diferencias significativas durante las fases de multiplicación y enraizamiento y fueron transferidas con éxito a condiciones *ex vitro*. No obstante, los tallos procedentes de las líneas embriogénicas más jóvenes mostraron mayor vigor durante la etapa de elongación, dando lugar a brotes axilares de longitud más elevada.

En segundo lugar se abordó la puesta a punto de un protocolo de crioconservación eficiente para embriones somáticos de olivo. Con este propósito, se llevó a cabo una serie de experimentos encaminados a optimizar el método de vitrificación en gota sobre tiras de aluminio, desarrollado para ápices de banana. Los resultados obtenidos permitieron establecer las variables básicas del protocolo. Asimismo se comprobó que las condiciones previas de cultivo determinan la respuesta de los embriones somáticos a la crioconservación, observándose un efecto significativo del método de cultivo, en medio sólido o líquido, y de la fase de crecimiento en la que fueron recolectados los explantos. El método de crioconservación no afectó de forma negativa al proceso de embriogénesis somática en ninguna de las tres líneas testadas. No obstante, el estudio de su aplicabilidad a un número elevado de líneas puso

de manifiesto la necesidad de una optimización adicional del mismo, ya que en la mayoría de los casos no se alcanzó el 40% de recuperación del cultivo recomendado. Con este fin se probaron diferentes precultivos con sacarosa. Los mejores resultados se obtuvieron con un tratamiento de 7 días en medio ECO sólido suplementado con sacarosa 0,2 M, con el que se consiguieron tasas de recuperación del cultivo superiores al 40% en el 90% de las líneas testadas. La incorporación al protocolo de crioconservación de este pretratamiento no afectó negativamente al proceso de embriogénesis somática ni al establecimiento *ex vitro* de las plantas regeneradas.

Finalmente, se evaluó el efecto de la embriogénesis somática a largo plazo y la crioconservación sobre la estabilidad de las plantas obtenidas. Para ello, se evaluó la fidelidad al tipo de plantas desarrolladas a partir de líneas embriogénicas distintas mantenidas *in vitro* mediante subcultivos repetitivos durante dos y ocho años. Las plantas fueron analizadas fenotípicamente, por comparación de diferentes caracteres morfológicos con los de plantas control procedentes de semilla, y genéticamente, utilizando marcadores RAPDs. Todos los parámetros evaluados en el análisis morfológico se vieron afectados de forma significativa por el genotipo y la edad del cultivo. El análisis biométrico puso de manifiesto la existencia de individuos con hábitos de crecimiento variantes. El análisis mediante marcadores moleculares permitió detectar variación genética entre individuos regenerados a partir de la misma línea. Esta diversidad apareció en mayor grado en las líneas mantenidas durante más tiempo. La crioconservación, con o sin tratamiento previo con sacarosa, no dio lugar a la aparición de nuevos fenotipos variantes, ni afectó de forma significativa a ninguno de los parámetros morfológicos testados. El análisis con RAPDs puso de manifiesto la existencia de individuos con variación genética.

## SUMMARY

The olive (*Olea europaea* L.) is one of the oldest and more relevant crops of the Mediterranean basin due to its economic and environmental importance. The importance of this species justifies the development of breeding programmes to overcome some of the problems limiting the productivity of this crop. However, olive features such as its high level of heterozygosity, low fruit set, difficulties in seed germination and long juvenile period, significantly delay the obtaining of superior cultivars through classical breeding methods. Due to these factors, olive breeding largely depends on Molecular Biology and Biotechnology.

The application of biotechnological tools requires the availability of an efficient regeneration protocol allowing plant regeneration from a single cell. Like in other woody species, somatic embryogenesis is the regeneration method normally used in olive.

When used in breeding programmes, embryogenic cultures must be maintained for prolonged time periods, while carrying out biotechnological tests and field analysis. However, long-term *in vitro* maintenance of embryogenic cultures involves a series of drawbacks such as risk of loss of material by contamination or human error, loss of embryogenic potential or occurrence of somaclonal variation. Cryopreservation is considered the only effective and safe method for long-term conservation of plant germplasm.

The main objective of this thesis was to study the applicability of long-term somatic embryogenesis and cryopreservation in olive breeding programmes.

In a first phase, the effect of long-term maintenance of embryogenic cultures on the efficiency of somatic embryogenesis and the *ex vitro* establishment of the regenerated plants was evaluated. For this purpose, ten different embryogenic lines maintained by repetitive subcultures during two and eight years were used. Regardless of the genotype effect, that in some phases of the somatic embryogenesis process showed a decisive influence, the results revealed an increase of the proliferation rate with culture age as well as a modification of the proliferation pattern, presenting the oldest lines a faster and more disorganized growth. In both the maturation and germination phases, a decrease in efficiency was observed and, consequently, a significant decrease of the regeneration potential was found. Although in the oldest lines more shoots were obtained per germinated somatic embryo, these shoots were significantly shorter. Plantlets behaviour did not significantly differ during the multiplication and rooting phases and were successfully transferred to *ex vitro* conditions. Nevertheless, shoots derived from young embryogenic lines grew more vigorously during the elongation step, leading to longer axillary shoots.

Secondly, the development of an efficient cryopreservation protocol for olive somatic embryos was addressed. For this purpose, a series of experiments were carried out to optimize the droplet vitrification method on aluminium foil strips, developed for banana shoot apices. The results obtained permitted to establish the fundamental variables of the protocol. It was also found that previous culture conditions largely determine the response of olive somatic embryos to cryopreservation, being observed a significant effect of the culture method, in solid or liquid medium, and the growth phase of culture at which the explants were harvested. The cryopreservation method didn't negatively affect somatic embryogenesis in any of the three lines tested. Nevertheless, the study of its applicability to a high number of lines revealed the necessity of further optimization of this method, since in most cases, the recommended 40% of culture recovery was not reached. With this aim, different sucrose precultures were tested. The best results were obtained with a treatment in solid ECO medium supplemented with 0.2 M sucrose for 7 days, in which culture recovery rates higher than 40% were obtained in the 90% of the lines tested. Incorporation of this pretreatment to the cryopreservation protocol didn't affect

adversely to the somatic embryogenesis process or the *ex vitro* establishment of regenerated plants.

Finally, the effect of long-term somatic embryogenesis and cryopreservation was evaluated on the stability of the plants obtained. For this purpose, fidelity to type was assessed in plants regenerated from different embryogenic lines maintained *in vitro* by repeated subculturing for two and eight years. Plants were phenotypically analysed by morphological comparison of different features with those of control plants developed from seeds. All the parameters evaluated in the morphological analysis were significantly affected by both genotype and culture age. The biometric analysis revealed the existence of individuals showing variant growth habits. Genetic analysis by using RAPD markers allowed detecting the existence of genetic variation among plants regenerated from the same line, with greater diversity appearing in lines maintained for longer time. Cryopreservation, with or without sucrose preculture, did not give rise to new phenotypic variants or significantly affect any of the morphological parameters tested. Nevertheless, RAPD analysis revealed the existence of genetically variant individuals.

## **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL**

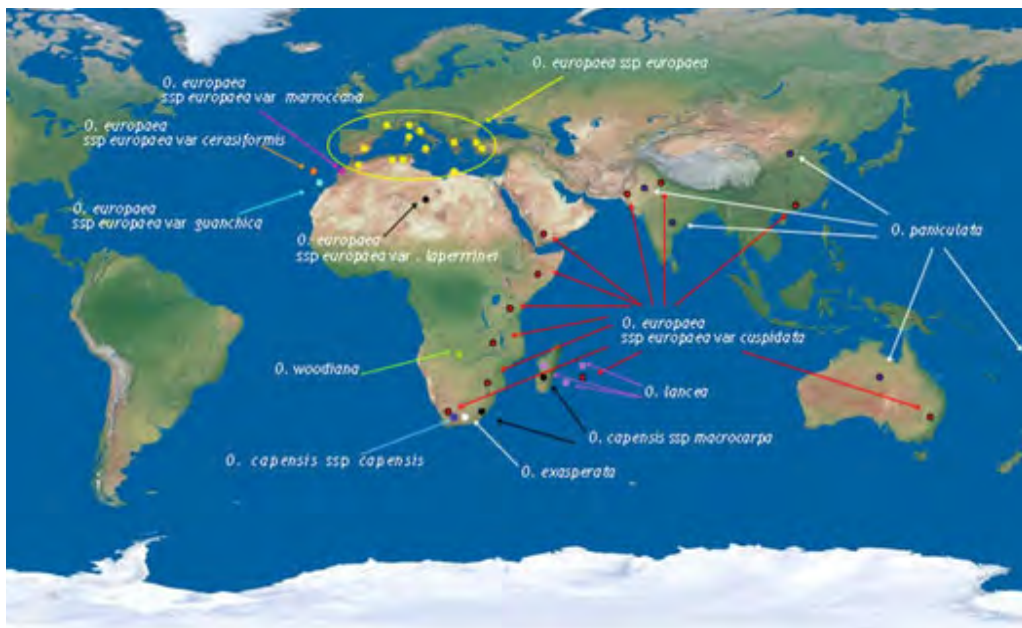




## I.1. Botánica y taxonomía

El olivo (*Olea europaea* L.) pertenece a la familia *Oleaceae*, género *Olea*. Este género se divide en tres subgéneros: *Tetrapilus*, *Paniculatae* y *Olea*, que se encuentran en Asia, Australia y Asia, y África y Europa, respectivamente. En el subgénero *Olea* se distinguen dos secciones: *Ligustroides*, con aproximadamente 10 especies, y *Olea*, con una sola especie, *O. europaea* L., que se extiende por el oeste del Sahara, las islas macaronésicas (Canarias y Madeira) y la cuenca mediterránea (Rugini *et al.* 2011).

De acuerdo con Green (2002), la especie *Olea europaea* L. puede dividirse en seis subespecies en base a sus características morfológicas, distribución geográfica y caracteres moleculares: subsp. *europaea* (cuenca mediterránea), subsp. *cuspidata* (Asia, península arábiga y este y sur de África), subsp. *laperrinei* (región del Sahara), subsp. *maroccana* (Marruecos), subsp. *cerasiformis* (islas Madeira) y subsp. *guanchica* (islas Canarias) (Fig. 1).



**Figura 1.** Distribución mundial de las principales especies y subespecies del género *Olea* (tomada de Rugini *et al.* (2011)).

*Olea europaea* subsp. *europaea* está presente en dos formas que constituyen dos variedades distintas: el olivo cultivado (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*) y el olivo silvestre (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*). El olivo cultivado incluye más de 1000 cultivares, aunque muchos de ellos pueden ser solo variedades locales con el mismo origen genético. También se ha propuesto que el olivo cultivado no es una especie sino un conjunto de diferentes ecotipos adaptados elevados al rango de subespecie, los cuales se originaron a través de mutaciones e hibridaciones naturales (Rugini *et al.* 2011).

El olivo es un árbol con una altura de 4 a 8 m, según la variedad (Fig. 2). El tronco es grueso y nudoso, con una corteza de color gris a verde grisáceo. La copa es redondeada o más o menos lobulada. Las hojas persisten en el árbol durante 2-3 años. Son simples, estrechamente lanceoladas o elípticas a ovaladas y con bordes enteros. Son de color verde oscuro por el haz y blanquecinas por el envés. La longitud del limbo oscila entre 3-9 cm y la anchura entre 1–1,8 cm. El nervio central es muy marcado y los secundarios muy poco aparentes. El peciolo es muy corto. En cada nudo aparecen dos hojas opuestas y los planos de distribución de las hojas de dos nudos consecutivos se disponen formando un ángulo de 90°

(Rapoport 1997). Las flores son pequeñas y actinomorfas (Rapoport 1997). Se disponen formando inflorescencias axilares o terminales, denominadas panículas, que agrupan flores hermafroditas o andromonoicas (Green 2002). El fruto es una drupa de forma elipsoidal a globular de longitud (1-4 cm) y calibre (0,6-2 cm) variables. El color del fruto es inicialmente verde y en la madurez se vuelve negro, negro-violáceo o rojizo (Rapoport 1997). También se forman frutos partenocárpicos, que se conocen como zofairones o azofairones y que no tienen valor económico (Rapoport 1997).



**Figura 2.** Árbol de olivo.

El olivo es una especie diploide con 23 pares de cromosomas ( $2n = 2x = 46$ ) (Loureiro *et al.* 2007). Su gran diversidad, así como los estudios citogenéticos, hacen suponer que se trata de un aloploiploide que proviene del cruzamiento entre diferentes especies del género *Olea* con números básicos de cromosomas 11 y 12 y posterior duplicación (Acevedo-Couthinho 1956). La falta de homología entre los 23 pares de cromosomas que forman su cariotipo también indica una naturaleza híbrida (Falistocco y Tosti 1996).

El tamaño del genoma del olivo varía entre distintos cultivares. Mientras que en cultivares portugueses oscila entre 2,90 y 3,07 pg/2C (Loureiro *et al.* 2007), en cultivares italianos fluctúa entre 3,90 y 4,66 pg/2C (Rugini *et al.* 1996; Bitonti *et al.* 1999).

## **I.2. Origen y distribución geográfica**

El origen del cultivo del olivo se sitúa en Palestina (Barranco *et al.* 2008) y se remonta, de acuerdo con Liphshitz *et al.* (1991), a la edad del Bronce (5200 años a.C.). La continua domesticación del olivo en los últimos 6000 años a través de la hibridación local de árboles cultivados con poblaciones naturales ha dado lugar a la alta diversidad genética que se observa entre los árboles cultivados en la cuenca mediterránea (Rugini *et al.* 2011).

Desde su lugar de origen, el olivo cultivado se propagó a otras zonas de la cuenca mediterránea acompañando las migraciones de diferentes civilizaciones (egipcios, fenicios, griegos, etruscos, romanos y árabes) (Rugini *et al.* 2011). De esta forma, se extendió por Chipre hacia Anatolia y, atravesando Creta, hacia Egipto; hasta poblar todos los países ribereños del Mediterráneo (Zohary 1994).

En el siglo XV, el olivo se expandió a África del Sur, China, Japón y Australia (Barranco *et al.* 2008). Con el descubrimiento de América, pasó el Océano Atlántico, extendiéndose hasta el

Nuevo Mundo. En los últimos 30-40 años del pasado siglo ha aumentado su área de distribución y se han introducido olivos cultivados en países como EE.UU., Australia, Sudáfrica, China, Corea y otros países asiáticos (Rugini 1995). En la actualidad, el olivo se concentra entre los 30° y 45° de latitud, tanto en el hemisferio Norte como en el hemisferio Sur, principalmente en las regiones de tipo mediterráneo, caracterizadas por un verano cálido y seco (Barranco *et al.* 2008).

### I.3. Importancia económica

El olivo constituye uno de los cultivos más antiguos y de mayor importancia de la cuenca mediterránea, tanto por su importancia social y económica como por su papel medioambiental. Con el aumento en los últimos años de su área de distribución, este cultivo ha adquirido gran importancia económica a nivel mundial.

La producción mundial y el consumo de aceite de oliva han aumentado significativamente en los últimos 30 años y se espera que continúen haciéndolo, considerando la reciente introducción de este cultivo en Japón, EE.UU., Australia, China, Sudamérica y Sudáfrica (Rugini *et al.* 2011).

El patrimonio oleícola mundial se estima en aproximadamente 1000 millones de olivos. El 90% del total se sitúa en los países del Mediterráneo, un 1,2% en el continente americano, un 0,4% en Asia oriental y otro 0,4% en Oceanía.

Según las estadísticas de la FAO (2011), la producción mundial de aceituna es de 19 845 300 toneladas, obtenidas en 9 634 576 ha. El 90% se destina a la extracción de aceite y el 10% se consume como aceitunas de mesa (Barranco *et al.* 2008).

Los países del sur de Europa constituyen los principales productores de aceite de oliva con un 75% de la producción total mundial, siendo España el principal productor (38,7%) seguido de Italia (21%) y Grecia (12,9%). Otros productores de aceite de oliva importantes son Turquía, Túnez y Siria, con un 17,1%, así como Jordania, Marruecos y Argelia (Baldoni y Belaj 2009).

La producción de aceitunas en España se ha estimado en 7 875 800 toneladas, obtenidas en una superficie de 2 500 000 ha (FAO 2013). Este cultivo se concentra mayoritariamente en la comunidad autónoma andaluza, con 2 914 286 toneladas de aceitunas producidas en una superficie de 1 542 640 ha (magrama 2012). Andalucía representa la tercera parte del olivar europeo, produciendo el 40% del aceite y el 20% de la aceituna de mesa en el mundo. Debido a su importancia económica y al papel del olivar como elemento de cohesión social, territorial y con un alto valor medioambiental, se ha desarrollado la ley del olivar de Andalucía (Ley 5/2011, de 6 octubre, del olivar de Andalucía), con el fin de mejorar y modernizar la producción del olivar, desarrollar las zonas oliveras para el mantenimiento de la población en el territorio y mejorar la calidad del aceite de oliva.

Aunque el principal uso del olivo es el alimentario, tanto para la producción de aceite de oliva como de aceituna de mesa, también se utiliza para otros fines tales como la producción de madera, la elaboración de productos cosméticos o el ornamental, en espacios públicos y privados (Domínguez-García 2012).

### I.4. Mejora genética

En la mejora del olivo se han planteado diferentes objetivos con el fin de superar diferentes inconvenientes que limitan la producción de este cultivo.

Los programas de mejora genética llevados a cabo en olivo han estado enfocados hacia el desarrollo de nuevos cultivares, con pocos estudios dirigidos a la selección de patrones. Entre los objetivos relacionados directamente con la producción se encuentran acortar el periodo no productivo, reduciendo el periodo juvenil, reducir la alternancia o vecería y aumentar el número y tamaño de los frutos obtenidos. Los programas de mejora de olivo también han ido encaminados a la autofertilidad y a modificar la arquitectura del árbol para adaptarlo a los sistemas de cultivo intensivos que están siendo aplicados actualmente, potenciando el enanismo y la adaptación a la recogida mecánica. Otros programas de mejora han estado enfocados en aumentar el contenido en aceite del fruto y mejorar la calidad del aceite de oliva (composición de ácidos grasos, contenido en fenoles, etc.) (Rugini y Baldoni 2005).

Las enfermedades y plagas provocan importantes pérdidas económicas. De ahí la importancia de desarrollar genotipos resistentes a patógenos tales como el repilo, causado por el hongo *Spilocaea oleagina*, la verticilosis, causada por el hongo *Verticillium dahliae*, o la tuberculosis, causada por la bacteria *Pseudomonas savastanoi*. La plaga más importante es la causada por la mosca del olivo, que ataca exclusivamente al fruto.

Distintos tipos de estrés abiótico también pueden afectar al rendimiento del cultivo por lo que dentro de los programas de mejora también se han incluido objetivos como la tolerancia al frío, a la sequía o a la salinidad.

Sin embargo, la mejora genética del olivo es complicada (Bellini 1990; Rugini *et al.* 1995; Fontanazza y Bartolozzi 1998). Entre las causas de esta dificultad se encuentran su alto nivel de heterocigosis (Carboni 2000; Rugini y Gutiérrez-Pesce 2006) y el que las flores de algunos cultivares muestren esterilidad masculina (Tombesi 1978; Fontanazza 1993; Bartolini y Guerriero 1995) o autofertilidad (Fontanazza *et al.* 1990), lo que exige una emasculación fastidiosa. También se incluyen un bajo nivel de cuajado del fruto (1-4%), tanto en la naturaleza (Morettini 1972; Griggs *et al.* 1975) como después de una polinización controlada (Lavee y Datt 1978), o dificultades en la germinación de las semillas, que en muchos cultivares es lenta y tiene lugar con tasas muy bajas (Acebedo *et al.* 1997). No obstante, el factor que más ha condicionado la mejora genética de esta especie ha sido su largo periodo juvenil, que depende del genotipo y en términos generales supera los 10 años (Rugini y Baldoni 2005), pero que puede prolongarse hasta más de 15 años (Bellini 1993). Además, el control genético de los principales caracteres en selección todavía no se conoce (De la Rosa *et al.* 2003). Aspectos como el vigor del árbol, el tamaño de la hoja y la forma del fruto parecen estar controlados por genes principales que muestran dominancia (Bellini *et al.* 2002a), mientras que la herencia de otros caracteres, como el tamaño del fruto, la intensidad de la floración, el cuajado del fruto, el tiempo de maduración o el rendimiento, aun se desconoce (Parlati *et al.* 1994; Bellini *et al.* 2002a).

A pesar de estos inconvenientes, que hacen problemática la aplicación en olivo de los métodos de mejora convencionales, se han llevado a cabo programas de mejora clásica por cruzamiento intervarietal en diferentes países como Turquía (Arsel y Cirik 1994), Marruecos (Rallo 1995; Leon *et al.* 2004a, 2007), Túnez (Trigui 1996), Israel (Lavee *et al.* 1999; 2003), Grecia (Prista *et al.* 2003), Italia (Fontanazza *et al.* 1998; Bellini *et al.* 2002a) e Irán. En muchos casos el proceso de selección sigue todavía en curso y son pocos los nuevos genotipos que se han obtenido (Baldoni y Belaj 2009). Entre las nuevas variedades generadas se encuentran 'Maalot', seleccionada por su resistencia a *Spilocaea oleagina* (Lavee *et al.* 1999); 'Barnea', seleccionada por su crecimiento vigoroso; 'Askal', seleccionada por su adaptación y buen rendimiento en olivares de alta densidad (Lavee *et al.* 2003), y 'Kadeshon', 'Sepoka' y 'Masepo' seleccionadas para producción de aceituna de mesa (Lavee *et al.* 2004). También se han seleccionado los cultivares italianos 'Arno', 'Tevere' y 'Basento' por su vigor, producción,



rendimiento y características del fruto (Bellini *et al.* 2002).

En España se inició en 1992 un programa de mejora de olivo con dos objetivos principales: la precocidad de la producción y la productividad de aceite (Rallo 1995). Recientemente se ha descrito un nuevo cultivar, ‘Chiquitita’, obtenido a partir del cruzamiento entre ‘Picual’ y ‘Arbequina’. Este cultivar se caracteriza por su producción temprana, alto contenido en aceite y elevado rendimiento, además de por su bajo vigor, copa compacta y ramas pendulares, que lo hacen adecuado para sistemas de cultivo intensivo (Rallo *et al.* 2008). Posteriormente se inició un programa de mejora de olivo para la obtención de variedades resistentes a la verticilosis, enfermedad que supone la mayor amenaza fitosanitaria para el olivar (León *et al.* 2013). Cuatro de los genotipos evaluados mostraron el mismo nivel de resistencia que ‘Frantoio’, cultivar resistente a este patógeno, y dieron resultados prometedores en la evaluación agronómica en campo. El nivel de resistencia y comportamiento agronómico de estos genotipos deberá ser confirmado en trabajos futuros.

En definitiva, hoy día hay más de 1000 cultivares en uso, la mayor parte de los cuales se han originado a partir de selecciones llevadas a cabo durante siglos por los agricultores. Sólo algunos cultivares han sido desarrollados por mejora genética y la mayoría de ellos están en fase de ensayo o apenas han iniciado su difusión comercial (Rugini y Baldoni 2005).

### 1.5. Aplicación de herramientas biotecnológicas en la mejora

En el olivo, el largo periodo de generación retrasa la obtención de cultivares superiores a través de métodos clásicos de mejora por lo que, al igual que en otras especies, la mejora depende en gran medida de la Biotecnología y la Biología Molecular (Baldoni y Belaj 2009).

En lo que se refiere a las herramientas de Biología Molecular, los marcadores moleculares que ponen de manifiesto polimorfismos en el ADN son herramientas útiles en estudios genéticos y en la mejora de plantas. Así, la selección asistida por marcadores permite una evaluación temprana de la progenie y, por lo tanto, acelerar el desarrollo de nuevos cultivares (Rallo *et al.* 2008).

En olivo, los marcadores basados en el ADN han sido ampliamente utilizados, tanto en estudios teóricos como aplicados (Bracci *et al.* 2011). No obstante, y a pesar de los avances obtenidos, el conocimiento de la base genética de los caracteres de interés es escaso, habiéndose publicado pocos mapas genéticos de esta especie (Domínguez-García *et al.* 2012). El primer mapa de ligamiento de *Olea europaea* fue elaborado por De la Rosa *et al.* (2003) con la progenie del cruzamiento entre ‘Leccino’ y ‘Dolge Agogia’, dos cultivares altamente heterocigóticos, utilizando marcadores dominantes basados en la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), tales como RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) y AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), y marcadores codominantes, tales como RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) y SSRs (*Simple Sequence Repeats*). Posteriormente se construyeron otros mapas utilizando RAPDs, SSRs y SCARs (*Sequence Characterized Amplified Region*) con la progenie obtenida del cruce de ‘Frantoio’ x ‘Kalamata’ (Wu *et al.* 2004) o utilizando los marcadores SSRs y AFLPs con la progenie del cruzamiento de ‘Picholine marocaine’ x ‘Picholine du Languedoc’ (El Abidine *et al.* 2010). Recientemente se ha descrito un nuevo mapa, construido con la progenie del cruzamiento entre los cultivares ‘Olivière’ y ‘Arbequina’, en el que se han detectado QTLs (*Quantitative Trait Loci*) con pocos efectos, poniendo de manifiesto el control multigénico de los caracteres de comportamiento de reproducción. En este trabajo, se identificaron progenies con poca alternancia, que podrían constituir un material interesante para los programas de selección (Sadok *et al.* 2013).

El desarrollo del proyecto OLEAGEN (<https://chirimoyo.ac.uma.es/oleagen/>) ha

permitido avances importantes en el estudio del genoma y la mejora genética de olivo. El primer objetivo de este proyecto ha sido el desarrollo de un mapa de ligamiento de la progenie obtenida del cruzamiento 'Picual' x 'Arbequina' y el establecimiento de una colección nuclear del Banco del Germoplasma Mundial de Olivo (IFAPA Centro de Córdoba) basada en el análisis genético usando marcadores moleculares. Durante la realización del mismo, Domínguez-García *et al.* (2012) desarrollaron el uso de marcadores DArT (*Diversity Array Technology*) en olivo, demostrando que tenían una gran calidad y reproducibilidad y que podían constituir una herramienta muy útil en los estudios de diversidad, descubrimiento de QTLs y mapeo en esta especie. El segundo objetivo del proyecto fue el desarrollo de herramientas genómicas en olivo y el establecimiento de una base de datos genómica y agronómica y de una plataforma bioinformática asociada. Finalmente, el tercer objetivo fue la identificación de genes asociados a la calidad del fruto y del aceite y a otros caracteres agronómicos.

En los últimos años también se han hecho esfuerzos en la identificación de ESTs (*Expressed Sequence Tags*), con interés especial en las secuencias expresadas durante el desarrollo del fruto y en alérgenos del polen. Muy recientemente, la secuenciación del genoma de cloroplastos ha suministrado información novedosa sobre la secuencia de nucleótidos del olivo (Bracci *et al.* 2011).

En lo que se refiere a las herramientas biotecnológicas, la transformación genética representa una alternativa poderosa para acelerar el desarrollo de cultivares superiores.

En olivo, la transferencia de genes se ha llevado a cabo tanto mediante cultivo con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como a través del bombardeo con partículas cubiertas de ADN (Rugini *et al.* 2011). En 1999, Lambardi *et al.* (1999) probaron diferentes dispositivos y condiciones de bombardeo para la transformación genética de embriones somáticos (ES) del cultivar 'Canino'. Paralelamente, Mencuccini *et al.* (1999) usaron *A. tumefaciens* para introducir los genes *rolABC* en el cultivar 'Dolce Agogia' utilizando peciolos como explantos iniciales. Posteriormente se describió la transformación genética de ES del cultivar 'Canino' con los genes *rolABC* de *A. rhizogenes*, para modificar el crecimiento vegetal, y el gen osmotin, para incrementar la resistencia al estrés biótico (Rugini *et al.* 2000; Rugini y Gutiérrez-Pesce 2006; D'Angeli y Altamura 2007).

Utilizando ES de olivo obtenidos a partir de radículas del cultivar 'Picual', Pérez-Barranco *et al.* (2009) intentaron poner a punto un protocolo de transformación genética mediante biobalística empleando el sistema PDS-1000/He. No obstante, utilizando esta aproximación no se consiguió la transformación estable de los tejidos embriogénicos. Más adelante, Torreblanca *et al.* (2010) desarrollaron un protocolo eficiente y reproducible de transformación genética de ES de olivo utilizando la cepa AGL1 de *A. tumefaciens*.

Además de su utilización para la aplicación de técnicas como la transformación genética, el cultivo de tejidos ha contribuido de forma importante a la mejora de cultivos de interés agronómico a través de otras aproximaciones tales como la producción de dihaploides, la variación somaclonal, la mutación *in vitro*, la selección *in vitro*, el rescate de embriones o la micropropagación de material vegetal con características mejoradas.

La producción de plantas de olivo homocigóticas por autofertilización parece muy improbable teniendo en cuenta la característica autoesterilidad y el largo periodo juvenil de la especie. Sin embargo, las plantas homocigóticas son de gran interés para el aislamiento de mutantes y de caracteres recesivos. El cultivo de polen y óvulos se ha llevado a cabo con el objetivo de producir plantas dihaploides por duplicación del número de cromosomas. Así, Mulé *et al.* (1992) y Perri *et al.* (1994b) hicieron esfuerzos importantes para obtener haploides en olivo pero los resultados obtenidos no fueron claros. Posteriormente, se aplicaron nuevos

métodos de cultivo de microsporas aisladas consiguiendo división celular y formación de proembriones en el cultivar 'Arbequina' (Bueno *et al.* 2006).

El cultivo de protoplastos es útil para intentar la fusión de los mismos con el objetivo de producir híbridos a partir de especies o variedades de cruzamiento incompatible. Además, los protoplastos permiten llevar a cabo modificaciones genéticas mediante la introducción de ADN exógeno por liposomas u orgánulos celulares (Rugini *et al.* 2011). En olivo, se han aislado y cultivado protoplastos viables a partir de hipocótilos, cotiledones y hojas de brotes micropropagados y en algunos casos se han obtenido resultados positivos (Rugini 1986; Cañas *et al.* 1987; Mencuccini 1991; Perri *et al.* 1994a). No obstante, esta tecnología no puede ser aplicada por el momento porque aún no se ha conseguido la regeneración de plantas a partir de callo procedente de protoplastos.

El término variación somaclonal describe la variación genética que ocurre en células, tejidos y plantas cultivadas *in vitro* así como en las plantas regeneradas a partir de los mismos y en su progenie (Larkin y Scowcroft 1981). Esta posibilidad de cambio hace de la variación somaclonal una fuente de variabilidad genética que puede ser aprovechada en programas de mejora de cultivos. En este sentido, la variación somaclonal supone una alternativa para la ampliación de la base genética frente a métodos convencionales u otros biotecnológicos más controvertidos, como la transformación genética. De hecho, la evaluación y selección de variantes puede resultar en el desarrollo de nuevos cultivares (Skirvin *et al.* 1994; Mohan 2001; Chen *et al.* 2003). Analizando caracteres morfológicos y marcadores RAPDs, Leva y Petruccioli (2012) describieron la aparición de variantes somaclonales en plantas de olivo del cultivar 'Frangivento' regeneradas vía embriogénesis somática a partir de cotiledones inmaduros.

La frecuencia de la variación somaclonal se puede incrementar a través de modificaciones en las condiciones del cultivo *in vitro* o mediante la utilización de agentes mutagénicos. En olivo, la irradiación de plántulas de los cultivares 'Leccino' y 'Frantoio' dio lugar a plantas enanas, autoestériles y con floración tardía (Pannelli *et al.* 1990).

Además, se pueden crear condiciones de presión selectiva con agentes tanto de origen biótico como abiótico, como el filtrado de hongos, toxinas purificadas de patógenos, alta presión osmótica, etc.

Recientemente se ha utilizado la técnica del rescate de embriones con buenos resultados en plantas híbridas obtenidas del cultivar 'Mary' y una variedad iraní local (Hosseini Ava y Hajnajari 2006).

El cultivo de tejidos también permite la multiplicación vegetativa a gran escala de plantas de interés agronómico (Altman y Hasegawa 2012).

## I.6. Métodos de regeneración

La capacidad de una sola célula para dividirse y dar lugar a una planta completa, conocida como totipotencia celular, es la base teórica y experimental de la biotecnología vegetal moderna. La aplicación de herramientas biotecnológicas requiere disponer de un método de regeneración eficiente que permita la obtención de plantas a partir de una sola célula. Este proceso de regeneración se puede conseguir a través de dos vías: organogénesis adventicia o embriogénesis somática.

La organogénesis es el proceso por el cual células y tejidos son forzados a sufrir una serie de cambios que tienen como resultado final la producción de una estructura unipolar, que puede ser un primordio de tallo o de raíz, cuyo sistema vascular está a menudo conectado con el tejido madre (Thorpe 1990). Los nuevos meristemas adventicios tienen deseablemente un

origen unicelular, aunque hay casos en los que varias células pueden participar en la formación de los mismos (Marcotrigiano 1986).

En el olivo, la regeneración de brotes vía organogénesis se obtuvo por primera vez de forma directa a partir de secciones de hipocótilo (Bao *et al.* 1980). Posteriormente, Cañas y Benbadis (1988) consiguieron una alta tasa de regeneración de brotes a partir de callos derivados de fragmentos de cotiledones maduros de los cultivares 'Tanche' y 'Picual' (Cañas y Benbadis 1988). Márquez *et al.* (1999) también describieron resultados positivos usando cotiledones de embriones maduros del cultivar 'Picual'. Mencuccini y Rugini (1993) y Rugini y Caricato (1995) consiguieron obtener plantas a partir de peciolo de plantas adultas propagadas *in vitro*. A pesar de esto, en la actualidad, la vía organogénica no constituye un método eficiente para regenerar plantas de olivo, aunque algunos autores la consideran una primera etapa esencial para la inducción de embriogénesis somática a partir de explantos de origen adulto (Rugini *et al.* 2011).

La embriogénesis somática es el proceso por el cual células somáticas se desarrollan a través de estados de la embriogenia para dar lugar a plantas completas sin fusión gamética. Esta técnica presenta una serie de ventajas respecto a la organogénesis adventicia entre las que se encuentran el origen unicelular del embrión, la ausencia de conexiones vasculares con el tejido de origen, la producción simultánea de ápice y raíz, índices de multiplicación elevados y facilidad para la mecanización (Mathews y Wetzstein 1993).

Al igual que en otras especies leñosas (Gupta *et al.* 1993), la embriogénesis somática es el método de regeneración normalmente utilizado en olivo (Baldoni y Belaj 2009). De hecho, en la mayoría de las investigaciones llevadas a cabo en los últimos años, los cultivos embriogénicos constituyen los tejidos diana para la aplicación de herramientas biotecnológicas.

Cuando se utilizan en programas de mejora, los cultivos embriogénicos deben ser mantenidos durante periodos prolongados de tiempo, mientras se llevan a cabo los ensayos biotecnológicos y los análisis en campo. Aunque en teoría los cultivos embriogénicos pueden ser mantenidos durante tiempo ilimitado, distintos inconvenientes pueden surgir durante el mantenimiento prolongado mediante subcultivos repetitivos tales como la pérdida de la capacidad regenerativa y la variación somaclonal.

En olivo se ha conseguido la regeneración de plantas vía embriogénesis somática con tasas aceptables utilizando diferentes protocolos (Cerezo *et al.* 2011; Benzekri y Sánchez-Romero 2012). Sin embargo, en ninguno de ellos se ha evaluado el efecto del tiempo de mantenimiento en proliferación sobre la eficiencia de la embriogénesis somática o la estabilidad genética de las plantas obtenidas.

## I.7. Crioconservación de ES de olivo

Además de los problemas expuestos anteriormente, el mantenimiento *in vitro* a largo plazo de cultivos embriogénicos presenta otros inconvenientes como el consumo importante de tiempo y el riesgo de pérdida del material por contaminación o error humano (Teresa *et al.* 2010; Yin y Hong 2010).

Las técnicas de cultivo *in vitro* a baja temperatura (4°C) son de gran interés para la colección y el almacenamiento de germoplasma vegetal pero la conservación a largo plazo en estas condiciones también presenta el riesgo de la variación somaclonal (Larkin y Scowcroft 1981) y la pérdida por contaminación (Engelmann 1997).

La crioconservación se considera el único método efectivo y seguro para la conservación a largo plazo de germoplasma vegetal (Engelmann 2004). Este método requiere un espacio



pequeño, un mantenimiento limitado, los cultivos están protegidos de la contaminación y pueden ser almacenados sin alteraciones o modificaciones genéticas durante un periodo de tiempo teóricamente ilimitado (Engelmann 2004). Además, en cultivos embriogénicos, evita la disminución o pérdida de competencia embriogénica que tiene lugar con el tiempo (Reed 2008).

Los cultivos embriogénicos de olivo pueden ser muy heterogéneos. Algunas líneas celulares proliferan como callo mientras que otras están compuestas principalmente por ES en diferentes estadios de desarrollo (Sánchez-Romero *et al.* 2009).

Inicialmente en olivo, se utilizaron indistintamente callo embriogénico y ES como tejidos diana para la aplicación de herramientas biotecnológicas (Lambardi *et al.* 1999; Pérez-Barranco *et al.* 2007; Pérez-Barranco *et al.* 2009). Sin embargo, en los últimos años, los ES se han convertido en los explantos principalmente utilizados para la transformación genética de esta especie (Torreblanca *et al.* 2010; Jafarzadeh-Bajestani *et al.* 2011).

Aunque, en general, los cultivos embriogénicos son considerados tejidos apropiados para la crioconservación, ES y callo embriogénico son estructuralmente muy diferentes. Mientras que el callo embriogénico usualmente consiste en una población homogénea de células pequeñas, poco vacuoladas y en división activa, los ES son estructuras complejas con una composición celular heterogénea (Gonzalez-Arno *et al.* 2008) en la que predominan las células grandes, diferenciadas y altamente vacuoladas. La composición celular determina significativamente la respuesta de los explantos a la crioconservación debido a la diferente tolerancia a los procesos de desecación y congelación (Van den Houwe y Panis 2000). En general, las características celulares del callo embriogénico hacen a este tejido más apropiado para superar la crioconservación que los ES. En olivo, el callo embriogénico ha sido crioconservado con éxito usando el método de vitrificación en gota (Sánchez-Romero *et al.* 2009). Sin embargo, ninguno de los protocolos testados en ES de esta especie han dado lugar a tasas de recuperación del cultivo superiores al 40%, mínimo requerido para un almacenamiento seguro de germoplasma (Reed 2001), lo que revela la necesidad de continuar investigando en esta línea.

## I.8. Estabilidad genética

La obtención de plantas a través de técnicas de cultivo *in vitro* como la embriogénesis somática debería producir, en teoría, individuos genéticamente idénticos al material de partida. Sin embargo, existe el riesgo de aparición de variación somaclonal, que es de naturaleza imprevisible (Jain *et al.* 1998) y puede provocar cambios a distintos niveles: morfológicos, bioquímicos, genéticos y/o epigenéticos (Rahman y Rajora 2001; Etienne y Bertrand 2003; Peredo *et al.* 2006; El-DougDoug *et al.* 2007). Investigaciones llevadas a cabo en diferentes sistemas experimentales han señalado que dichos cambios pueden ocurrir tanto durante el proceso de embriogénesis somática (Isabel *et al.* 1996; Fourré *et al.* 1997; Burg *et al.* 2007), como durante la crioconservación de tejidos vegetales (De Verno *et al.* 1999; Harding 2004; Marum *et al.* 2009).

Este fenómeno constituye un grave problema, no solo en los sistemas de propagación clonal, sino también en los programas de mejora basados en aproximaciones biotecnológicas, en los que la obtención de genotipos élite requiere una inversión importante de tiempo y dinero. El desastre económico debido a la variación somaclonal es especialmente importante en las plantas leñosas, en las que los ensayos de campo se prolongan durante años. Esto pone de manifiesto la necesidad de determinar la posible aparición de variación somaclonal debida a los distintos procesos a los que se someten los cultivos embriogénicos durante su utilización en los programas de mejora de cultivos.



## OBJETIVOS



## OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis ha sido estudiar la aplicabilidad en programas de mejora genética de olivo de la embriogénesis somática a largo plazo y la crioconservación. Este objetivo se ha dividido en los siguientes objetivos parciales:

1. Evaluar el efecto del mantenimiento a largo plazo de cultivos embriogénicos sobre la eficiencia de la embriogénesis somática y el establecimiento *ex vitro* de las plantas regeneradas.
2. Desarrollar un protocolo eficiente de crioconservación de ES de olivo.
3. Evaluar el efecto de la embriogénesis somática a largo plazo y la crioconservación sobre la estabilidad genética de las plantas regeneradas.



## **CAPÍTULO II. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA A LARGO PLAZO**





## II.1. Introducción

La embriogénesis somática se debe al fenómeno de “totipotencia celular” según el cual las células somáticas de una planta, aunque estén diferenciadas, contienen toda la información necesaria para regenerar una planta completa.

La embriogénesis somática ha sido utilizada como método de regeneración, para la propagación masiva de cultivos de interés comercial y como sistema modelo para estudiar la regulación del desarrollo embriogénico en plantas (Kiyosue *et al.* 1993; Zimmerman 1993).

### II.1.1. Fases del proceso de embriogénesis somática

La regeneración de plantas vía embriogénesis somática tiene lugar a través de una secuencia variable de etapas. Normalmente, el proceso incluye las fases de inicio de cultivos embriogénicos, proliferación de cultivos embriogénicos, maduración de ES y germinación. Para ejecutar este patrón de forma eficiente se deben aplicar una serie de tratamientos físicos y químicos en el momento apropiado (von Arnold 2008). A pesar de esta separación en fases, las modificaciones o factores aplicados en una etapa determinada pueden tener repercusiones en fases posteriores (Bozhkov *et al.* 2002).

#### II.1.1.1. Inicio de cultivos embriogénicos

La inducción de embriogénesis somática consiste en la supresión del patrón de expresión génica existente en una célula diferenciada y su reemplazamiento por un programa de expresión génica embriogénica (von Arnold *et al.* 2002) bajo los estímulos apropiados (Merkle *et al.* 1995; Mujib *et al.* 2005). De esta forma, tiene lugar una desdiferenciación celular y las células somáticas se convertirán en células embriogénicas (Namasivayam 2007).

El inicio de la embriogénesis somática está restringido a células que tienen un potencial de activación de genes responsables de la formación de células embriogénicas a nivel del explanto. De entrada, pocas células son competentes para el inicio de callos embriogénicos (von Arnold 2008).

La inducción de embriogénesis somática puede ser directa o indirecta, dependiendo de si el embrión somático se inicia directamente sobre el explanto o si se requiere cierta proliferación celular no organizada, tipo callo (Evans *et al.* 1981; Sharp *et al.* 1982). La embriogénesis somática directa es la aproximación más deseable para la regeneración de plantas genéticamente estables ya que la formación de callo puede causar variación somaclonal (Mizukami *et al.* 2008). No obstante, la mayoría de los sistemas de embriogénesis somática presentan una fase de formación de callo, a partir del cual se formarán posteriormente los ES.

El proceso de inducción es dependiente del genotipo y en la mayoría de los casos solo tiene lugar a partir de explantos juveniles (Neumann 2000; Fehér 2005), limitando el uso de esta técnica en plantas de interés agronómico.

#### II.1.1.2. Proliferación de cultivos embriogénicos

Uno de los aspectos más importantes de la embriogénesis somática radica en la capacidad de los cultivos para proliferar indefinidamente, lo que hace de esta técnica una herramienta muy útil en la regeneración y propagación de especies vegetales (Merkle 1995).

Una vez que se han inducido las células embriogénicas, la proliferación de las mismas

normalmente da lugar a masas proembriogénicas (PEMs) constituidas por células pequeñas ( $400\text{-}800\ \mu\text{m}^3$ ), angulares, conectadas entre sí por numerosos plasmodesmos ( $2\text{-}4$  por  $\mu\text{m}^2$ ), con vacuolas pequeñas (30% del volumen celular), numerosos gránulos de almidón ( $5\text{-}25$  por célula), alta densidad de ribosomas y numerosos filamentos de retículo endoplasmático rugoso, entre otras características (McWilliam *et al.* 1974; Emons *et al.* 1992; Emons 1994).

En general, los cultivos embriogénicos se mantienen en un medio de cultivo similar al utilizado para la inducción de los mismos, aunque en algunos casos se incorporan ligeras variaciones. El control de los niveles de auxinas es un aspecto importante para conseguir la proliferación continua e indefinida de los cultivos. Una reducción excesiva de la concentración de esta hormona puede dar lugar a la histodiferenciación de ES, limitando la proliferación del cultivo. Niveles altos de auxinas pueden resultar en una embriogénesis repetitiva (Merkle *et al.* 1995), pero su continua presencia puede favorecer la elongación celular y la disgregación de las PEMs. Así, si la concentración de auxina es demasiado alta o los subcultivos se hacen con demasiada frecuencia eventualmente se puede perder el potencial embriogénico de los cultivos (Bhojwani y Razdan 1996).

Los cultivos pueden ser mantenidos en medio sólido. Sin embargo, para la multiplicación a gran escala generalmente se establecen cultivos en medio líquido debido a su mayor tasa de proliferación y a la sincronización de los mismos. En los cultivos en suspensión, las células se desarrollan individualmente y, en consecuencia, pueden ser separadas fácilmente por filtración o centrifugación antes de su cultivo o manipulación.

### II.1.1.3. Desarrollo y maduración de ES

La auxina, necesaria para la proliferación de las PEMs, inhibe al mismo tiempo el desarrollo de ES a partir de estas estructuras (Nomura y Komamine 1985; De Vries *et al.* 1988; Filonova *et al.* 2000a). En general, la histodiferenciación completa de los ES se logra tras la eliminación total de la auxina exógena del medio de cultivo. La transición de PEM a embrión juega un papel importante en el proceso de embriogénesis somática como enlace entre la proliferación de PEMs y el desarrollo embriogénico organizado. La incapacidad de muchas líneas embriogénicas para formar ES bien desarrollados parece asociada a una transición PEM-embrión defectuosa o bloqueada. De acuerdo con Zimmerman (1993), con la retirada de la auxina se elimina el bloqueo en la expresión de los genes responsables de la transición a la etapa corazón por lo que para estimular el desarrollo de ES es necesario transferir los cultivos embriogénicos a un medio sin esta hormona (von Arnold 2002).

Durante el desarrollo del embrión, después de la histodiferenciación se inicia la fase de maduración, en la que las células dejan de dividirse, extendiéndose y acumulando sustancias de reserva (Bewley y Black 1985). Durante este proceso, los ES sufren cambios morfológicos y bioquímicos importantes. La obtención de ES de calidad depende en gran medida de una acumulación correcta de los productos de reserva y de un aumento considerable del peso de los embriones durante la fase de maduración (Merkle *et al.* 1995).

Los productos de reserva acumulados en ES presentan las mismas características que los de embriones zigóticos (EZ) (Merkle *et al.* 1995). No obstante, estudios sobre la acumulación de reservas en el desarrollo de ES han puesto de manifiesto tanto similitudes como diferencias remarcables en relación con los EZ. Así, tanto la cantidad de productos de reserva como el momento en el que se acumulan, pueden ser diferentes en ambos tipos de embriones. Estas diferencias pueden deberse a las condiciones utilizadas para la maduración *in vitro*. La optimización de las condiciones de cultivo puede probablemente aumentar la similitud observada entre EZ y ES. Para la mayoría de las especies, la desecación y el tratamiento con

ácido abscísico (ABA) favorecen la maduración de los embriones.

Este aspecto es fundamental ya que solo aquellos embriones maduros que hayan acumulado suficientes sustancias de reserva y adquirido tolerancia a la desecación al final de la maduración, se desarrollarán como plantas.

La monitorización de marcadores tales como los niveles de transcripción de proteínas de reserva o los propios compuestos de reserva, puede proporcionar los medios para estimar el grado de maduración. Esto puede permitir determinar el momento apropiado para cambiar los ES de tratamientos de maduración a tratamientos de germinación (Merkle *et al.* 1995).

En general, la maduración constituye la fase más difícil y crítica del proceso de embriogénesis somática (Litz *et al.* 1998), dependiendo la calidad de los ES obtenidos y su conversión en plantas del explanto inicial y el genotipo (Stasolla y Yeung 2003).

#### II.1.1.4. Germinación de ES

Al igual que los EZ, los ES deben tener meristemos funcionales capaces de dar lugar a brotes y raíces durante el proceso de germinación (Jain *et al.* 2002). En la mayoría de los trabajos no se diferencia entre germinación y conversión en planta (Merkle *et al.* 1995). Sin embargo, la germinación consiste en el desarrollo de brote y/o raíz mientras que la conversión hace referencia a la supervivencia y el desarrollo de la planta en condiciones ambientales *ex vitro*. La capacidad para obtener plantas *in vitro* no es necesariamente un indicador de que el crecimiento continúe con vigor después de la aclimatación a condiciones *ex vitro* (Anandarajah y Mckersie 1990a, b; Fujii *et al.* 1990; Senaratna *et al.* 1990), de ahí la necesidad de distinguir entre ambos parámetros.

La germinación de ES normalmente tiene lugar en medios de cultivo sólidos o en medios líquidos con diferentes tipos de soportes. Las diferentes fórmulas minerales utilizadas son muchas veces diluidas a la mitad, lo que implica que las diferentes etapas del proceso de embriogénesis exigen concentraciones diferentes de sales (Merkle *et al.* 1995). En el cultivo de los EZ también se ha observado que los medios con bajas concentraciones de sales aumentan los porcentajes de germinación y favorecen la formación de las raíces (Emershad y Ramming 1994). El medio de germinación debe contener una fuente de carbono, normalmente sacarosa. A pesar de su germinación, los ES no son capaces de desarrollar un comportamiento autótrofo y necesitan concentraciones de sacarosa al menos del orden del 2% para desarrollar un sistema radicular adecuado (Roberts *et al.* 1993).

La germinación puede producirse en medios de cultivo sin hormonas (Stasolla y Yeung 2003), aunque la adición de citoquininas favorece la elongación del brote apical y puede contrarrestar el efecto negativo de las auxinas aplicadas durante la fase de histodiferenciación (Merkle *et al.* 1995). En general, esta fase se lleva a cabo en condiciones de luz (Webster *et al.* 1990).

#### II.1.2. Embriogénesis somática en olivo

##### II.1.2.1. Inicio de cultivos embriogénicos

En olivo, al igual que en otras especies leñosas (Neumann 2000; Fehér 2005), el éxito en la inducción de cultivos embriogénicos ha estado, hasta hace pocos años, restringida al uso de explantos de origen juvenil. En 1988, Rugini (1988) describió la obtención de cultivos

embriogénicos a partir de EZ inmaduros de los cultivares ‘Dulce Agogia’, ‘Leccino’, ‘Frantoio’ y ‘Moraiolo’. Leva *et al.* (1995), Leitao y Fevereiro (1998) y Maalej *et al.* (2002) también utilizaron EZ, aunque en distintos estadios de desarrollo. En la mayoría de los explantos, la embriogénesis somática tuvo lugar de forma directa, sin formación previa de callo. Trabajando con olivos silvestres y cultivados, Orinos y Mitrakos (1991) y Mitrakos *et al.* (1992) recomendaron la utilización de radículas aisladas de embriones maduros. También se han obtenido resultados positivos usando la raíz principal de semillas germinadas *in vitro* (Rugini 1995). Por su parte, Shibli *et al.* (2001) probaron diferentes explantos de origen juvenil tales como secciones de hoja, peciolo o segmentos de hipocótilo o de raíz, obteniendo los mejores resultados de formación de callo embriogénico con segmentos de raíces.

La inducción de embriogénesis somática a partir de material adulto ha sido descrita en los cultivares ‘Canino’ y ‘Moraiolo’ utilizando hojas enteras no expandidas y peciolo procedentes de brotes regenerados vía organogénesis adventicia (Rugini y Caricato 1995). El aumento de la capacidad morfogénica por regeneración recurrente se ha apuntado que es esencial en algunas especies para la inducción de embriogénesis somática a partir de explantos de origen adulto (Rugini y Caricato 1995). Recientemente, Capelo *et al.* (2010) consiguieron iniciar cultivos embriogénicos a partir de peciolo y hojas procedentes de plantas adultas de olivo silvestre. Trabelsi *et al.* (2011) también han descrito la inducción de embriogénesis somática utilizando hojas adultas del cultivar ‘Chetoui’ cultivadas *in vitro*.

Las sales utilizadas para inducir embriogénesis somática en olivo dependen del tipo de explanto y del genotipo, aunque en la mayoría de los casos se han utilizado variaciones del medio de olivo (OM) (Rugini 1984). Los medios de cultivo para la inducción de embriogénesis somática en olivo normalmente se suplementan con auxinas y citoquininas. Así, Orinos y Mitrakos (1991) y Mitrakos *et al.* (1992) utilizaron para la inducción de callo embriogénico a partir de secciones de radículas, el medio OMc (Cañas y Benbadis 1988) suplementado con ácido indol-3-butírico (IBA) (25  $\mu$ M) y 6- $\gamma$ - $\gamma$ (dimetilalilamino)purina (2iP) (2,5  $\mu$ M).

### II.1.2.2. Proliferación de cultivos embriogénicos

En lo que se refiere a la proliferación y mantenimiento de cultivos embriogénicos de olivo, estos pueden ser cultivados sobre papel filtro humedecido con medio OMc líquido y, después del subcultivo a medio OMc sólido sin hormonas y con carbón activo al 0,1% (p/v), pueden ser mantenidos con subcultivos mensuales durante años, a través de ciclos de embriogénesis secundaria (Rugini y Baldoni 2005). Shibli *et al.* (2001) mantuvieron callos embriogénicos de olivo en medio CCM, consistente en la formulación MS (Murashige y Skoog 1962) suplementada con 5,0  $\mu$ M 6-bencilaminopurina (BAP), 0,5  $\mu$ M ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 5,0  $\mu$ M ácido naftalenacético (ANA).

Cerezo *et al.* (2011) probaron dos medios basales con diferente fuerza iónica para el mantenimiento de callo embriogénico: OMc y ECO (Pérez-Barranco *et al.* 2009). Aunque no observaron diferencias significativas en el incremento de peso medio por subcultivo, el aspecto de los cultivos varió considerablemente. En medio OMc una gran cantidad de los ES formados se oscurecían al final del subcultivo y las estructuras globulares desaparecían, mientras que en el medio ECO las masas proembriogénicas continuaban dando lugar a estructuras globulares.

### II.1.2.3. Desarrollo y maduración de ES

Al igual que en otros sistemas de embriogénesis somática, la maduración también ha constituido la fase crítica del proceso en olivo. A pesar de que Benelli *et al.* (2001) obtuvieron

tasas de producción de embriones elevadas, una alta proporción de los mismos no llegaba a convertirse en plantas. Trabelsi *et al.* (2003) probaron diferentes carbohidratos y formas de nitrógeno en el medio de maduración y llegaron a la conclusión de que era mejor utilizar sacarosa y emplear diferentes fuentes de nitrógeno. El ABA ha sido utilizado para sincronizar la formación de embriones de olivo (Rugini y Baldoni 2005), aunque también se ha descrito la maduración de ES en medio sin reguladores de crecimiento (Benelli *et al.* 2001).

Pocos estudios sistemáticos se habían realizado sobre la maduración de ES de olivo (Rugini y Baldoni 2005). Recientemente, Benzekri y Sánchez-Romero (2012) estudiaron el efecto de diferentes factores sobre la maduración y posterior capacidad de germinación de ES de esta especie. Utilizando como base el medio ECO, testaron la influencia del tipo de recipiente de cultivo y de diferentes concentraciones de sacarosa, ABA y phytigel, en presencia o ausencia de carbón activo. Los mejores resultados se obtuvieron en placas de Petri con medio basal de maduración y concentración estándar de sacarosa (20 g l<sup>-1</sup>). En estas condiciones se mejoró significativamente la producción de ES, consiguiendo un potencial de regeneración de 3,75 embriones por cultivo iniciado en la fase de maduración que daban lugar a tallo o tallo y raíz.

Cerezo *et al.* (2011) cultivaron embriones globulares de 1-3 mm sobre membranas de diálisis de acetato de celulosa colocadas sobre medio ECO. Dicho tratamiento se aplicó en la primera o la segunda mitad de un periodo de maduración de 8 semanas. Los tratamientos con membrana disminuyeron significativamente la formación de embriones maduros, aunque aumentaron su conversión en plantas.

#### II.1.2.4. Germinación de ES

Rugini y Baldoni (2005) germinaron ES de olivo en medio OMc líquido con agitación orbital a 80 rpm. La tasa de conversión disminuyó con el tiempo, aunque la elongación de la raíz ocurrió rápidamente en medio líquido con 1,36 µM de zeatina.

Para la germinación de ES de olivo también se ha utilizado medio MS (Murashige y Skoog 1962) suplementado con 2,5 µM zeatina y 20 g l<sup>-1</sup> sacarosa, aunque los resultados obtenidos fueron pobres en todos los casos (Rugini 1995; Márquez *et al.* 1999). Intentos para aumentar la tasa de conversión mediante tratamientos de frío o con inhibidores de reguladores de crecimiento, se han mostrados ineficientes (Rugini y Baldoni 2005).

Diferentes autores han utilizado el medio de Clavero-Ramírez (1994), consistente en el medio MS con los macronutrientes reducidos a un tercio y 10 g l<sup>-1</sup> de sacarosa (Benzekri 2007, Pérez-Barranco *et al.* 2009; Torreblanca *et al.* (2009); Cerezo *et al.* 2011).

#### II.1.3. Efecto del tiempo de cultivo sobre el proceso de embriogénesis somática

Como se indicó anteriormente, los cultivos embriogénicos pueden ser subcultivados y mantenidos en medio con reguladores de crecimiento de forma teóricamente indefinida. Sin embargo, periodos prolongados de tiempo pueden afectar al potencial morfogénico de los cultivos, provocando una pérdida de su potencial de regeneración (von Arnold 2008). Generalmente, existe un periodo corto, consistente en uno o varios subcultivos, durante el cual aumenta la regeneración (Reinert y Backs 1968; Reinert *et al.* 1971). A este le sigue una etapa de alta capacidad regenerativa, después de la cual esta generalmente disminuye (von Arnold 2008), aunque algunos cultivos mantienen su capacidad de regeneración a lo largo del tiempo.

El genotipo tiene una influencia importante sobre la pérdida de la capacidad regenerativa

de un cultivo, ya que determina la naturaleza de la embriogénesis repetitiva. La mayoría de los efectos dependientes del genotipo son causados por la interacción de este factor con el ambiente de cultivo. Debido a la especificidad genotípica, los medios y condiciones culturales habitualmente necesitan ser puestos a punto para cada género, especie o cultivar (von Arnold 2008).



## II.2. Material y métodos

### II.2.1. Material vegetal

El material vegetal utilizado consistió en cultivos embriogénicos de olivo (*Olea europaea* L.) iniciados a partir de radículas de EZ maduros del cultivar 'Picual'. Se utilizaron 10 líneas embriogénicas distintas mantenidas mediante subcultivos repetitivos durante 2 (T1, T2, T3, T4 y T5) y 8 años (P1, P2, P3, P4 y P5).

### II.2.2. Medios de cultivo

Durante los experimentos se utilizaron los siguientes medios de cultivo (Tabla 1):

- Medio de mantenimiento ECO (Pérez-Barranco *et al.* 2009) consistente en el medio OMe de Cañas y Benbadis (1988), con sustitución de los microelementos OM (Rugini 1984) por los de la formulación MS y suplementado, de acuerdo con Rugini y Caricato (1995) con 0,25  $\mu\text{M}$  de IBA, 0,44  $\mu\text{M}$  de BAP, 0,5  $\mu\text{M}$  de 2iP, 200 mg  $\text{l}^{-1}$  de cefotaxima y 1 g  $\text{l}^{-1}$  de caseína hidrolizada. Como agente gelificante se utilizó phytigel (3 g  $\text{l}^{-1}$ ).

- Medio de producción de ES ECO<sup>-</sup> consistente en el medio ECO (Pérez-Barranco *et al.* 2009) sin reguladores de crecimiento ni cefotaxima.

- Medio de germinación de Clavero-Ramírez (1994) consistente en la formulación MS con los macroelementos y la sacarosa reducidos a un tercio y solidificado con 6 g  $\text{l}^{-1}$  de agar.

- Medio de multiplicación y elongación de brotes consistente en el medio DKW (Driver y Kuniyuki 1984) con IBA 0,05  $\mu\text{M}$  y BAP 4,40  $\mu\text{M}$  (Revilla *et al.* 1996).

- Medio de enraizamiento consistente en las sales del medio DKW a la mitad, con sacarosa al 2% e IBA 0,50  $\mu\text{M}$ , sin vitaminas ni aminoácidos (Revilla *et al.* 1996).

El pH de todos los medios de cultivo se ajustó a 5,74 con NaOH (0,1 y 1N) y HCl (0,1 y 1N), tras lo cual se añadió el agente gelificante consistente en phytigel (3 g  $\text{l}^{-1}$ ) o agar (6 g  $\text{l}^{-1}$ ).

Los medios de mantenimiento de cultivos embriogénicos (ECO) y de producción de ES (ECO<sup>-</sup>) se esterilizaron en autoclave durante 20 min a 121°C y 0,1 MPa. Posteriormente, en una cabina de flujo laminar, se distribuyeron en alícuotas de 25 ml en tubos de 25 x 150 mm estériles (Bellco Glass) o placas de Petri de 90 x 16 mm o de 50 ml en placas de Petri de 90 x 25 mm. Los tubos se cubrieron con tapones de polipropileno (Bellco Glass INC. Kaputs) y las placas se sellaron con Parafilm.

La cefotaxima se esterilizó utilizando unidades de filtración para jeringuillas con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millex-Millipore). Posteriormente, se añadió en condiciones de esterilidad al medio de cultivo previamente esterilizado y enfriado, antes de su distribución en recipientes de cultivo.

En los medios de germinación de ES, multiplicación y enraizamiento, se añadió el agente gelificante al medio totalmente preparado y se licuó durante 7 minutos en autoclave a 121°C y 0,1 MPa. A continuación, los medios se repartieron en alícuotas de 50 ml en frascos de 85 x 80 mm (Sigma), de 40 ml en frascos de 95 x 60 mm (Sigma) o de 25 ml en tubos de 25 x 150 mm (Bellco Glass). Los frascos se cubrieron con tapaderas de plástico y los tubos con tapones de polipropileno. Finalmente, los frascos se esterilizaron durante 20 min y los tubos durante 15 min en las mismas condiciones de presión y temperatura indicadas anteriormente.

**Tabla 1.** Composición de los medios de cultivo utilizados.

Componentes	Medio de mantenimiento	Medio de producción de ES	Medio de germinación	Medio de elongación	Medio de enraizamiento
<b>Macroelementos (mM)</b>					
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,28	1,28	6,87	1,75	8,76
KNO <sub>3</sub>	2,71	2,71	6,26	-	-
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,75	0,75	1,00	0,98	0,49
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,50	1,50	0,50	3,00	1,50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,62	0,62	0,42	3,90	1,95
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,62	0,62	-	4,99	4,15
KCl	1,68	1,68	-	-	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-
<b>Microelementos (μM)</b>					
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	25,07	25,07	100,27	77,63	38,82
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	25,00	25,00	100,00	195,24	97,62
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	7,48	7,48	29,91	-	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,26	0,26	1,03	1,57	0,79
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,10	0,96	0,48
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,028	0,028	0,11	-	-
KI	1,25	1,25	5,00	-	-
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	25,00	25,00	100,00	136,5	70,03
Na <sub>2</sub> EDTA	25,00	25,00	100,00	139,5	69,74
Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	-	-	-	57,15	28,57
<b>Vitaminas (μM)</b>					
Tiamina.HCl	0,74	0,74	0,30	5,90	-
Piridoxina.HCl	1,22	1,22	2,43	-	-
Ácido nicotínico	2,31	2,31	4,06	8,04	-
Glicina	13,32	13,32	26,64	26,50	-
Ácido fólico	0,57	0,57	-	-	-
D-Biotina	0,10	0,10	-	-	-
<b>Polialcoholes (mM)</b>					
mio-inositol	0,28	0,28	0,55	5,55	5,55
<b>Reguladores de crecimiento (μM)</b>					
IBA	0,25	-	-	0,05	0,5
2iP	0,50	-	-	-	-



BAP	0,44	-	-	2,9	-
<b>Otros componentes (mg l<sup>-1</sup>)</b>					
Glutamina	550	550	-	-	-
Caseína hidrolizada	1000	1000	-	-	-
Cefotaxima	200	-	-	-	-
<b>Azúcares (mM)</b>					
Sacarosa	58,43	58,43	29,21	87,64	58,43

### II.2.3. Condiciones ambientales

La cámara de cultivo se mantuvo a una temperatura constante de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , día y noche. La irradiancia fue de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporcionada por lámparas Grolux de Sylvania de espectro regular, con un fotoperiodo de 16 horas de luz al día. La humedad relativa fue del 60-70%.

### II.2.4. Inicio de cultivos embriogénicos

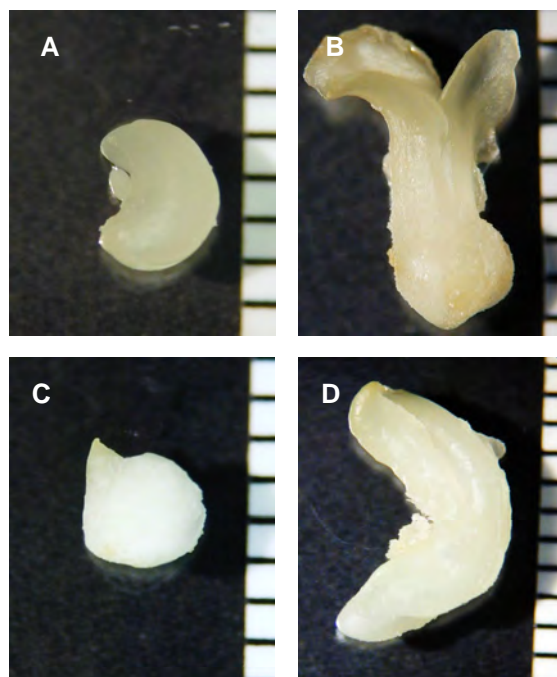
La inducción de cultivos embriogénicos se llevó a cabo a partir de radículas de EZ maduros siguiendo el protocolo de Orinos y Mitrakos (1991). Las radículas aisladas se cultivaron durante 3 semanas en placas de Petri con medio OMc (Cañas y Benbadis 1988) suplementado con IBA  $25 \mu\text{M}$  y 2iP  $2,5 \mu\text{M}$ . Posteriormente, se transfirieron a medio OMc sin hormonas, donde se mantuvieron con recultivos mensuales a medio fresco hasta la aparición de callo embriogénico. Los callos se transfirieron a medio ECO de mantenimiento.

### II.2.5. Proliferación de cultivos embriogénicos

El mantenimiento de cultivos embriogénicos se llevó a cabo en medio ECO en condiciones de oscuridad. El subcultivo se realizó cada 5-6 semanas seleccionando material con características embriogénicas, consistente en callo de color beige o amarillento, traslúcido y de consistencia granular y friable, y ES en estadios tempranos de desarrollo.

Se estudió la proliferación de líneas embriogénicas de olivo mantenidas en medio ECO durante diferentes periodos de tiempo. Para ello, se utilizaron 10 líneas embriogénicas de dos edades diferentes: 2 (T1, T2, T3, T4, T5) y 8 años (P1, P2, P3, P4, P5). Se iniciaron 20 tubos por línea embriogénica y el experimento se repitió dos veces.

El experimento inició con 0,2 g de callo procedente de medio ECO. Los cultivos se mantuvieron durante 6 semanas en las condiciones indicadas anteriormente y posteriormente se evaluaron tomando datos de incremento de peso, aspecto (color, estado de agregación y tamaño de las estructuras) y presencia de ES en diferentes estadios de desarrollo (número de ES traslúcidos inferiores a 5 mm ( $\text{ESTr} < 5 \text{ mm}$ ) (3-4 mm), número de ES traslúcidos iguales o superiores a 5 mm ( $\text{ESTr} \geq 5 \text{ mm}$ ), número de ES blanco-opacos inferiores a 5 mm ( $\text{ESBO} < 5 \text{ mm}$ ) (3-4 mm) y número de ES blanco-opacos iguales o superiores a 5 mm ( $\text{ESBO} \geq 5 \text{ mm}$ ) (Fig. 3). Los ES de 1 y 2 mm no se contabilizaron en ningún caso.



**Figura 3.** ES de olivo obtenidos en medio ECO: A) ESTr < 5mm, B) ESTr ≥ 5mm, C) ESBO < 5mm y D) ESBO ≥ 5mm.

### II.2.6. Desarrollo y maduración de ES

De acuerdo con Benzekri y Sánchez-Romero (2012), el desarrollo y maduración de ES de olivo se realizó en placas de Petri de 90 x 25 mm con 50 ml de medio medio ECO sin reguladores de crecimiento ni cefotaxima (ECO<sup>-</sup>), en condiciones de oscuridad.

Se estudió el efecto de la edad del cultivo sobre su capacidad para producir ES en estadios avanzados de desarrollo. Para ello, se utilizaron las líneas P1, P2, P3, P4 y P5 y T1, T2, T3, T4 y T5, de 8 y 2 años, respectivamente. Se iniciaron 20 cultivos por línea embriogénica y el experimento se repitió dos veces.

La producción de ES se inició con 0,1 g de estructuras embriogénicas con un tamaño igual o inferior a 2 mm. Después de 8 semanas en condiciones de desarrollo, se evaluó el aspecto general del cultivo, número de ESTr < 5 mm, número de ESTr ≥ 5 mm, número de ESBO < 5 mm y número de ESBO ≥ 5 mm. Los ES de 1 y 2 mm no se contabilizaron ya que su pequeño tamaño hacía muy poco probable su germinación y conversión en planta.

### II.2.7. Germinación de ES

Para inducir la germinación, ES procedentes de la fase de desarrollo con un tamaño igual o superior a 3 mm fueron cultivados de forma aislada en frascos de 85 x 80 mm con 50 ml de medio de Clavero-Ramírez (1994). La germinación se llevó a cabo en condiciones estándar de iluminación durante 2 recultivos de 6 semanas cada uno.

Se evaluó la capacidad de germinación de ES obtenidos a partir de cultivos embriogénicos de edades diferentes. Para ello, se utilizaron ES desarrollados a partir de las

líneas P1, P2, P3, P4 y P5 y T1, T2, T3, T4 y T5, de 8 y 2 años, respectivamente. El número de ES transferidos por línea a medio de germinación fue variable dependiendo del resultado de la fase de producción. El experimento se repitió en dos ocasiones.

Los ES se consideraron germinados cuando el desarrollo del tallo y/o la raíz fue igual o superior a 2 mm. Al final de cada recultivo, se tomaron datos de porcentaje de ES germinados, tipo de germinación (desarrollo de tallo y/o raíz), número de tallos por embrión germinado y calidad de las plantas obtenidas (longitud del tallo).

### II.2.8. Potencial de regeneración

Para evaluar el resultado global del proceso de embriogénesis somática, se calculó el potencial de regeneración de cada una de las líneas embriogénicas utilizadas en este estudio (P1, P2, P3, P4, P5, T1, T2, T3, T4 y T5). Se consideró como potencial de regeneración, el número de ES por cultivo iniciado en la fase de maduración que al final de la fase de germinación daban lugar a plantas con tallo o tallo y raíz.

### II.2.9. Multiplicación de brotes

Los brotes obtenidos en la germinación de ES se multiplicaron siguiendo el protocolo de Revilla *et al.* (1996). Secciones nodales de 1,0-1,4 cm de longitud con 2 yemas laterales fueron cultivadas en frascos de 95 x 60 mm con 40 ml de medio. La fase de multiplicación se llevó a cabo en condiciones estándar de iluminación con subcultivos a medio fresco a intervalos de 6 semanas.

Se realizó un experimento para comparar la capacidad de multiplicación de secciones nodales procedentes de ES obtenidos a partir de 3 líneas jóvenes (T2, T4 y T5) y 3 líneas antiguas (P2, P3 y P5). Se cultivaron 11-12 secciones nodales por línea embriogénica y el experimento se repitió 3 veces.

Al final de cada subcultivo, se tomaron datos de número de brotes axilares, longitud de los brotes axilares y aspecto general de los cultivos (presencia o ausencia de callo, oxidación del cultivo e hiperhidricidad).

### II.2.10. Enraizamiento de brotes

El enraizamiento se llevó a cabo utilizando brotes apicales con un tamaño igual o superior a 1,5 cm procedentes de la fase de multiplicación. Estos se cultivaron individualmente en tubos con 25 ml con medio de enraizamiento (Revilla *et al.* 1996). Los cultivos se incubaron durante 1 semana en oscuridad y posteriormente fueron transferidos a condiciones estándar de iluminación. Después de 8 semanas, se tomaron datos de porcentaje de brotes enraizados, número de raíces desarrolladas por brote, longitud de las raíces y aspecto general de los cultivos (presencia o ausencia de callo, oxidación del cultivo e hiperhidricidad).

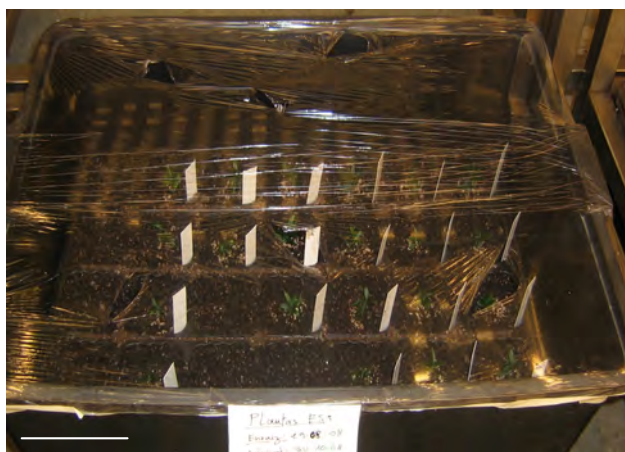
La capacidad de enraizamiento de brotes procedentes de cultivos jóvenes y antiguos se evaluó utilizando 3 líneas en cada caso (T2, T4 y T5 y P2, P3 y P5). Se pusieron a enraizar 4-5 brotes por línea embriogénica y el experimento se repitió 3 veces.

### II.2.11. Aclimatación

Después de 8 semanas en medio de enraizamiento, los brotes enraizados se pasaron a la

fase de aclimatación para su adaptación a las condiciones *ex vitro*. Las plántulas se lavaron con agua corriente para eliminar los restos de medio de cultivo y se transplantaron a semilleros de polietileno de 5,5 x 5,5 x 10 cm con una mezcla humedecida de mantillo y perlita en proporción 1:1 (Fig. 4). El semillero se colocó en el interior de una bandeja y se cubrió con una película de plástico transparente. Tras una semana, el plástico comenzó a abrirse de forma progresiva.

La fase de aclimatación se llevó a cabo en una cámara de crecimiento con una temperatura constante de 25°C, una humedad relativa del 60% y una irradiancia de 65  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .



**Figura 4.** Plántulas procedentes de ES durante la fase de aclimatación. Barra = 5 cm.

Se comparó la aclimatación de plántulas procedentes de cultivos embriogénicos jóvenes y antiguos. En cada caso se utilizaron 3 líneas embriogénicas (T2, T4 y T5 y P2, P3 y P5, respectivamente). Se aclimataron 4-5 plantas por línea embriogénica y el experimento se repitió 3 veces.

Después de 8 semanas, se tomaron datos de porcentaje de plantas supervivientes y aspecto general de las plantas aclimatadas.

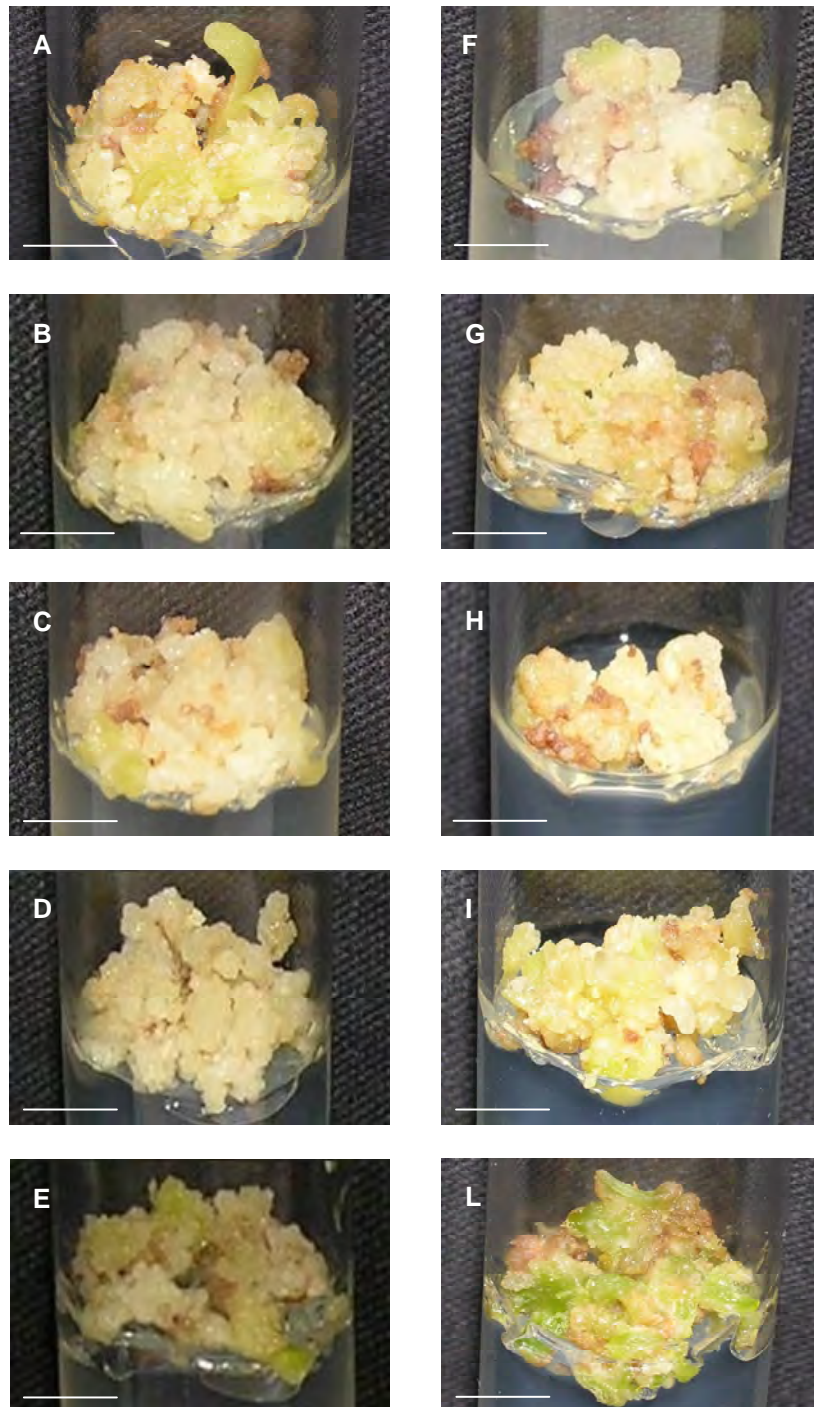
#### II.2.12. Análisis estadístico

Los datos del porcentaje se analizaron mediante análisis de frecuencias utilizando el test de independencia  $R \times C$ . Para el resto de datos se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) y las medias se separaron mediante el test de diferencia mínima significativa (DMS) (Sokal y Rohlf 2003). El nivel de significación fue 0,05 en todos los casos.

## II.3. Resultados

### II.3.1. Proliferación de cultivos embriogénicos

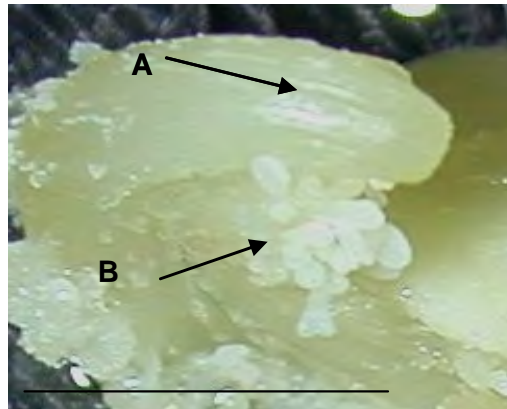
Al final de un ciclo de cultivo en medio de mantenimiento, las líneas embriogénicas utilizadas en este estudio presentaron aspectos claramente diferentes (Fig. 5). Mientras algunas proliferaron mediante formación continua de PEMs y ES en estadios tempranos de desarrollo,



**Figura 5.** Aspecto general de distintas líneas embriogénicas de olivo después de 6 semanas en medio de proliferación: A) P1, B) P2, C) P3, D) P4, E) P5, F) T1, G) T2, H) T3, I) T4 y L) T5. Barra = 1 cm.

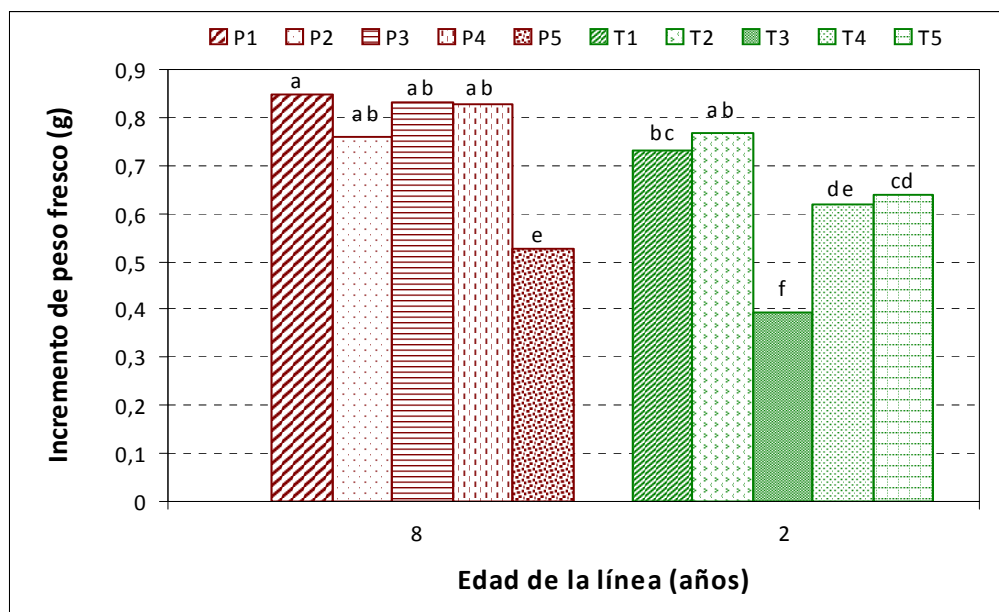


en otros casos los ES fueron las estructuras principalmente formadas. Aunque menos frecuentemente, también se apreciaron líneas en las que prácticamente solo se formó callo embriogénico. En algunos casos se observó embriogénesis secundaria, caracterizada por la formación de nuevos embriones a partir de un ES primario (Fig. 6).



**Figura 6.** Embriogénesis secundaria. A) Embrión primario, B) embriones secundarios. Barra = 0,5 cm.

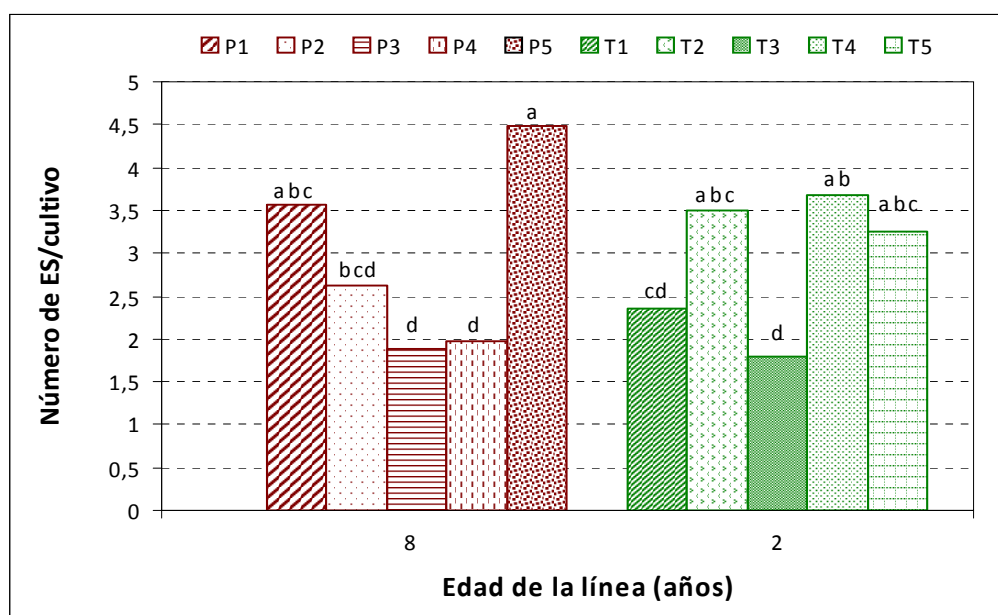
La tasa de proliferación de los cultivos se vio afectada significativamente tanto por el genotipo ( $P = 0,0000$ ) como por la edad de la línea ( $P = 0,0000$ ) (Fig. 7). Los valores de incremento de peso obtenidos después de 6 semanas en medio de mantenimiento variaron ampliamente entre líneas, con valores que oscilaron entre 0,39 y 0,85 g. Respecto a la edad del cultivo, las líneas más antiguas presentaron tasas de proliferación significativamente más elevadas (0,76 g) que las jóvenes (0,63 g).



**Figura 7.** Proliferación en medio de mantenimiento de líneas embriogénicas de olivo de edades diferentes.

El desarrollo de ES en medio de mantenimiento varió de forma significativa entre las

distintas líneas ( $P = 0,0000$ ), obteniéndose los valores más elevados en la línea P5, con 4,47 embriones/cultivo, y los más bajos en las líneas P3, P4 y T3, con menos de 2 embriones/cultivo (Fig. 8).



**Figura 8.** Efecto de la edad de la línea sobre el número de ES obtenidos en medio de proliferación.

Aunque no se apreció un efecto de la edad del cultivo sobre la producción total de embriones, cuando se evaluó la formación de ES en diferentes estadios de desarrollo se detectaron diferencias importantes debidas a este factor (Tabla 2). Así, los cultivos más antiguos se caracterizaron por una producción significativamente ( $P = 0,0019$ ) más alta de ESTr  $< 5$  mm (1,87 vs. 1,27) y una producción significativamente ( $P = 0,0000$ ) más baja de ESTr  $\geq 5$  mm (0,99 vs. 1,62). No se encontraron diferencias significativas en el desarrollo de ESBO, probablemente debido a la baja producción de este tipo de estructuras en ambos tipos de líneas. No obstante, la formación de ESBO  $\geq 5$  mm estuvo restringida a las líneas jóvenes.

El genotipo solo tuvo una influencia significativa sobre la producción de ESTr ( $P = 0,0082$  y  $P = 0,0000$ , para ESTr  $< 5$  mm y ESTr  $\geq 5$  mm, respectivamente).

En definitiva, los resultados obtenidos pusieron de manifiesto un efecto significativo del genotipo y de la edad del cultivo sobre la forma de proliferación de los cultivos embriogénicos de olivo. En general, las líneas más antiguas presentaron un crecimiento más rápido y desorganizado, caracterizado por una mayor proporción de callo embriogénico y ES en estadios tempranos de desarrollo. En las líneas jóvenes fue más frecuente la formación de ES en estadios de desarrollo avanzados.

**Tabla 2.** Efecto de la edad de la línea sobre la producción en medio de mantenimiento de ES en diferentes estadios de desarrollo.

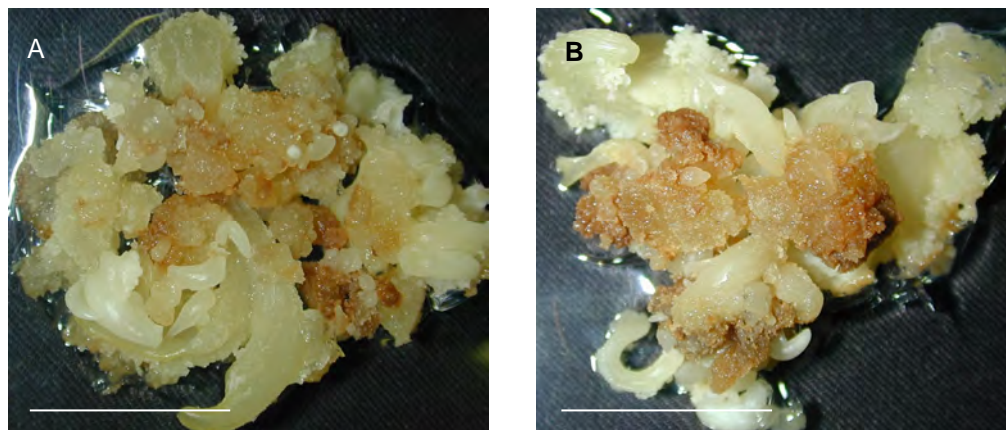
Tratamiento		Nº de ES en diferentes estadios de desarrollo			
Edad (años)	Línea embriogénica	Tr < 5 mm	Tr ≥ 5 mm	BO < 5 mm	BO ≥ 5 mm
<b>8</b>	P1	1,63bc	1,95a	0,00a	0,00a
	P2	2,20ab	0,43b	0,00a	0,00a
	P3	1,50bc	0,35b	0,03a	0,00a
	P4	1,50bc	0,38b	0,00a	0,00a
	P5	2,58a	1,89a	0,00a	0,00a
<b>Media</b>		<b>1,87a</b>	<b>0,99b</b>	<b>0,01a</b>	<b>0,00a</b>
<b>2</b>	T1	1,40bc	0,90b	0,03a	0,03a
	T2	1,28c	2,20a	0,00a	0,03a
	T3	1,03c	0,70b	0,05a	0,03a
	T4	1,60bc	2,03a	0,05a	0,00a
	T5	1,03c	2,25a	0,00a	0,00a
<b>Media</b>		<b>1,27b</b>	<b>1,62a</b>	<b>0,03a</b>	<b>0,02a</b>

### II.3.2. Desarrollo y maduración de ES

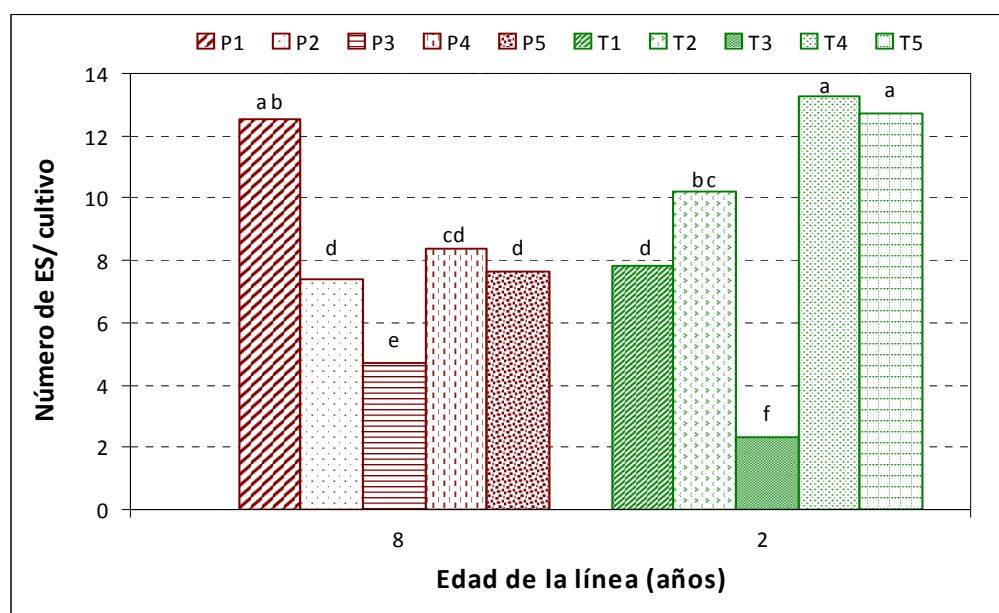
Durante la fase de desarrollo y maduración, la producción de ES tuvo lugar de forma asincrónica, con formación de embriones en diferentes estadios de desarrollo (globular, corazón, torpedo y cotiledonar) (Fig. 9). Durante el cultivo en medio ECO<sup>-</sup> también se apreció la aparición de embriones con hipocótilo extendido y crecimiento de los cotiledones sobre los que tenía lugar, en algunos casos, la formación de nuevos embriones o la proliferación de callo.

Los resultados de producción de ES pusieron de manifiesto un efecto significativo de la línea ( $P = 0,0000$ ) (Fig. 10). Mientras que en las líneas P1, T4 y T5 se obtuvieron más de 12 ES/cultivo, en la línea T3 sólo se desarrollaron 2,08 ES/cultivo. La edad de la línea también influyó de forma significativa ( $P = 0,0205$ ) sobre el rendimiento de esta fase, obteniéndose más embriones en las líneas jóvenes (9,33 ES/cultivo) que en las mantenidas en cultivo durante 8 años (8,07 ES/cultivo).





**Figura 9.** Aspecto general en medio de desarrollo de ES de A) una línea embriogénica mantenida durante 8 años (P1) y B) otra mantenida durante 2 años (T4). Barra = 1 cm.



**Figura 10.** Efecto de la edad de la línea sobre el número de ES obtenidos en medio de desarrollo.

El genotipo determinó la producción de todos los tipos de embriones formados en medio de desarrollo, excepto en el caso de los ESBO < 5 mm ( $P = 0,0000$ ,  $P = 0,0000$  y  $P = 0,0035$  para EStr < 5 mm, EStr  $\geq 5$  mm y ESBO  $\geq 5$  mm, respectivamente) (Tabla 3).

La edad del cultivo solo afectó la formación de EStr  $\geq 5$  mm ( $P = 0,0003$ ) y ESBO < 5 mm ( $P = 0,0180$ ) (Tabla 3). En ambos casos, la producción fue mayor en las líneas jóvenes, con 4,35 EStr  $\geq 5$  mm/cultivo y 0,09 ESBO < 5 mm/cultivo frente a 3,25 EStr  $\geq 5$  mm/cultivo y 0,02 ESBO < 5 mm/cultivo obtenidos en las líneas antiguas. Por lo tanto, la mayor producción de ES observada en las líneas jóvenes se debió fundamentalmente a un mayor desarrollo de EStr  $\geq 5$  mm. Aunque la producción de ESBO fue muy baja en todos los casos, se vio favorecida en los cultivos más jóvenes. Además, mientras que todas las líneas mantenidas en proliferación durante 2 años fueron capaces de producir este tipo de embriones, algunas líneas antiguas, como P1 y P4, fueron incapaces de hacerlo (Tabla 3).

**Tabla 3.** Efecto de la edad de la línea sobre la producción en medio de desarrollo de ES en diferentes estadios de desarrollo.

Tratamiento		N° de ES en diferentes estadios de desarrollo			
Edad (años)	Línea embriogénica	Tr < 5 mm	Tr ≥ 5 mm	BO < 5 mm	BO ≥ 5 mm
8	P1	5,95ab	5,58a	0,00c	0,00b
	P2	4,35d	2,93bc	0,03bc	0,03b
	P3	2,63e	2,00cd	0,03bc	0,00b
	P4	5,50bcd	2,75bc	0,00c	0,00b
	P5	4,75cd	2,93bc	0,03bc	0,00b
Media		4,76a	3,25b	0,02b	0,00a
2	T1	4,23d	3,53b	0,03bc	0,03b
	T2	4,49d	5,44a	0,15ab	0,10a
	T3	1,08e	1,00d	0,03bc	0,00b
	T4	7,55a	5,50a	0,20a	0,00b
	T5	6,17abc	6,53a	0,03bc	0,00b
Media		4,76a	4,35a	0,09a	0,03a

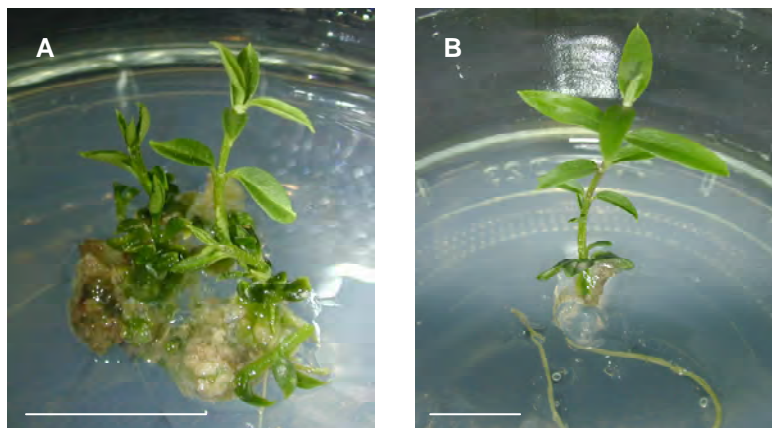
### II.3.3. Germinación de ES

La figura 11 muestra la germinación de ES procedentes de cultivos embriogénicos mantenidos en medio de proliferación durante 2 y 8 años.

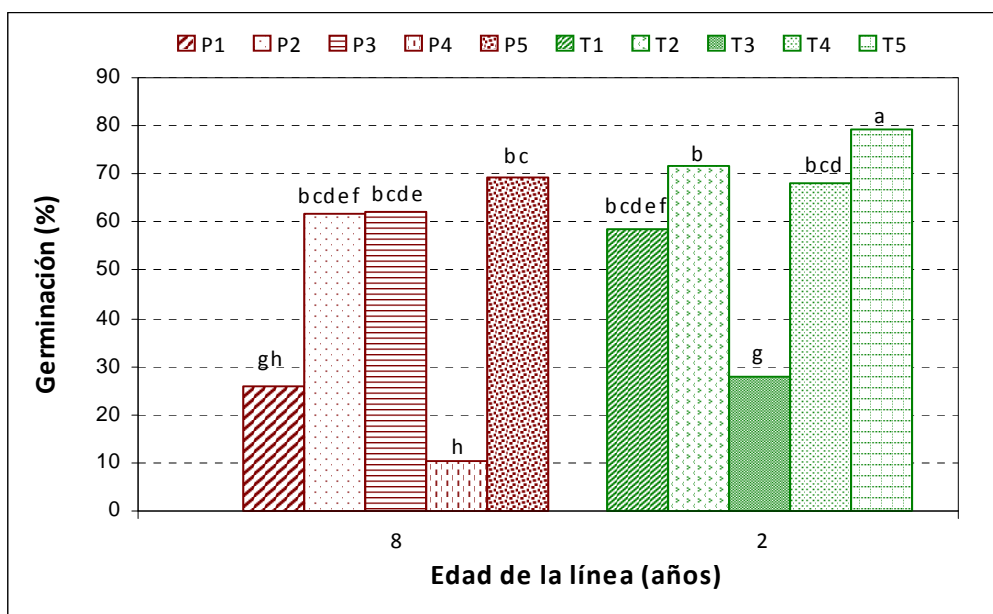
Los resultados obtenidos mostraron una gran variabilidad en la capacidad de germinación de los ES obtenidos a partir de líneas diferentes ( $P = 0,0000$ ), con valores que oscilaron entre el 10,45% y el 78,93% (Fig. 12). La edad de los cultivos también tuvo una influencia significativa ( $P = 0,0000$ ) sobre esta fase del proceso, con porcentajes de germinación más elevados en las líneas jóvenes (69,51%) que en las antiguas (40,91%).

La determinación de la tasa de germinación en cada uno de los tipos de embriones obtenidos en la fase de desarrollo permitió establecer diferencias importantes (Tabla 4). En los ESBO no se apreciaron diferencias significativas debidas al genotipo o a la edad de la línea ya que todos los embriones de este tipo germinaron independientemente de su procedencia, salvo los obtenidos a partir de la línea T3. En los ESTr, sin embargo, se observaron diferencias significativas debidas a ambos factores, genotipo ( $P = 0,0000$  para ESTr < 5 mm y ESTr ≥ 5

mm) y edad del cultivo ( $P = 0,0000$  para  $ESTr < 5$  mm y  $ESTr \geq 5$  mm). Tanto los  $ESTr < 5$  mm como los  $ESTr \geq 5$  mm presentaron porcentajes de germinación más elevados cuando procedían de líneas jóvenes (69,57% vs. 42,24% para los  $ESTr < 5$  mm y 70,92% vs. 33,10% para los  $ESTr \geq 5$  mm).



**Figura 11.** Plántulas de olivo procedentes de la germinación de ES desarrollados a partir de A) una línea antigua (P5) y B) una línea joven (T5). Barra = 1 cm.



**Figura 12.** Efecto de la edad de la línea embriogénica sobre el porcentaje de germinación de los ES.

**Tabla 4.** Efecto de la edad de la línea sobre el porcentaje de germinación de ES en diferentes estadios de desarrollo.

Tratamiento		Germinación (%) de ES en diferentes estadios de desarrollo			
Edad (años)	Línea embriogénica	Tr < 5 mm	Tr ≥ 5 mm	BO < 5 mm	BO ≥ 5 mm
8	P1	29,71h	20,00hgil	–	–
	P2	52,86bcdefg	34,62h	100,00a	–
	P3	66,97bcde	50,79g	–	–
	P4	10,47hi	10,42m	–	–
	P5	67,75bcd	69,31bcd	100,00a	–
Media		42,24b	33,10b	100,00a	–
2	T1	63,29bcdef	70b	–	100,00a
	T2	70,86b	66,84bcdef	100,00a	100,00a
	T3	22,50hi	32,43hgi	–	00,00
	T4	69,58bc	67,49bcde	100,00a	–
	T5	82,76a	84,38a	100,00a	–
Media		69,57a	70,92a	100,00a	66,70

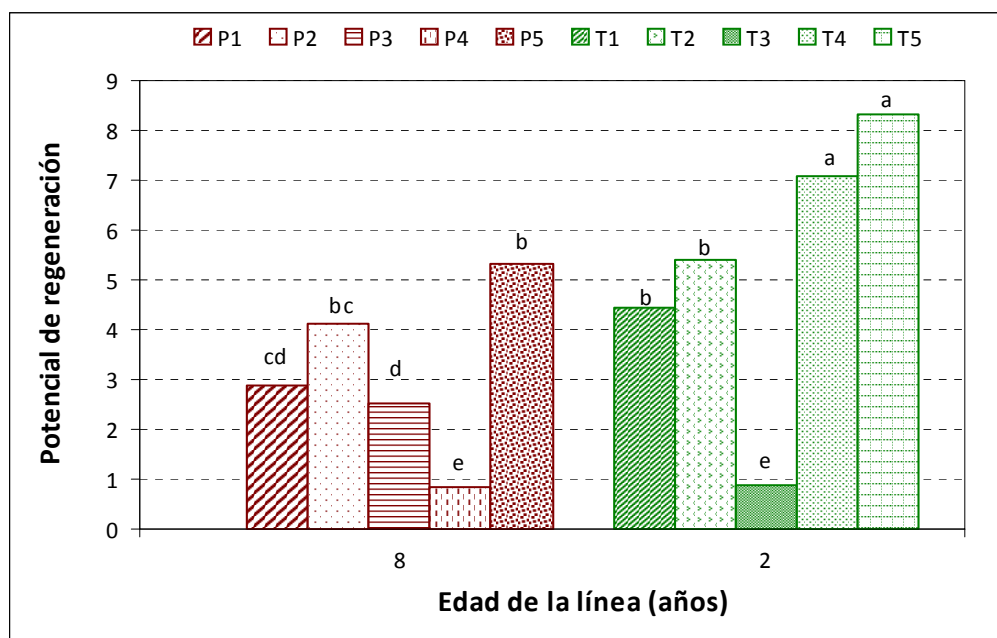
A pesar de los valores elevados de germinación obtenidos en ESBO, la germinación global obtenida en cada una de las líneas estuvo fundamentalmente determinada por el comportamiento de los ESTr, mucho más numerosos que los ESBO, que en todas las líneas presentaron producciones muy bajas.

### II.3.4. Potencial de regeneración

Durante la fase de germinación, los embriones desarrollaron plantas con brotes y/o raíces. Aunque la formación de raíces constituye una parte de la respuesta de los ES a las condiciones de germinación, los embriones que únicamente forman este tipo de estructuras no son realmente útiles para la obtención final de plantas. Con el objetivo de determinar el rendimiento real del proceso de embriogénesis somática, se determinó en cada una de las líneas el potencial de regeneración, así como otros parámetros relacionados con la calidad de las plántulas obtenidas.

El genotipo tuvo una influencia significativa sobre el potencial de regeneración ( $P =$

0,0000) (Fig. 13). La variabilidad observada fue muy alta, con valores que oscilaron entre 0,83 y 8,30 ES que dieron lugar a plantas con tallo o tallo y raíz por cultivo iniciado en la fase de maduración. Los valores más elevados se consiguieron en las líneas T4 y T5 mientras que los más bajos se obtuvieron en las líneas P4 y T3.



**Figura 13.** Efecto de la edad de la línea sobre el potencial de regeneración.

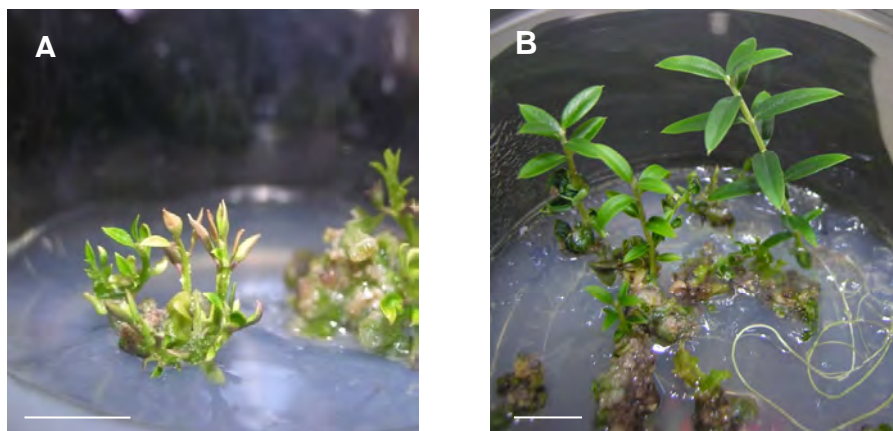
La edad del cultivo también tuvo un efecto significativo ( $P = 0,0000$ ) sobre el rendimiento del proceso, con valores más elevados en las líneas jóvenes (5,53) que en las mantenidas en proliferación durante más tiempo (3,16).

Además, tanto el genotipo como la edad de la línea tuvieron una influencia significativa sobre dos aspectos importantes relacionados con la calidad de las plántulas obtenidas: el número de brotes desarrollados por embrión germinado y la longitud de los tallos obtenidos (Tabla. 5). Independientemente del efecto de la línea ( $P = 0,0079$ ), el número de brotes desarrollados por embrión germinado fue significativamente ( $P = 0,0391$ ) más elevado en las líneas antiguas, con una media de 1,91 brotes frente a 1,74 obtenidos en embriones procedentes de líneas jóvenes (Tabla. 5) (Fig. 14). Respecto a la longitud de los tallos formados durante la germinación, se obtuvieron resultados significativamente ( $P = 0,0000$ ) mejores en las líneas jóvenes, con plántulas con una longitud media de 9,70 mm frente a 7,01 mm en las obtenidas a partir de líneas antiguas (Tabla. 5). El genotipo tuvo también una influencia importante ( $P = 0,0000$ ). De hecho, la longitud más elevada obtenida en las líneas jóvenes estuvo determinada en gran medida por los resultados obtenidos en las líneas T4 y T5, que presentaron tallos significativamente más largos que el resto de líneas, incluidas las otras de 2 años.

Por consiguiente, se puede concluir que, durante el proceso de germinación, los ES obtenidos a partir de cultivos mantenidos durante más tiempo dieron lugar a un número mayor de brotes pero significativamente más pequeños.

**Tabla 5.** Efecto de la edad de la línea sobre el número de brotes formados por ES germinado y la longitud de los mismos.

Tratamiento		N° de brotes/ES germinado	Longitud de los brotes (mm)
Edad (años)	Línea embriogénica		
8	P1	1,54b	6,80a
	P2	2,04a	6,14a
	P3	2,10a	6,80a
	P4	1,26b	5,74a
	P5	2,06a	8,14abc
Media		1,91a	7,01b
2	T1	1,78ab	7,29ab
	T2	1,64b	6,32a
	T3	1,90ab	6,07a
	T4	1,83ab	12,03c
	T5	1,71b	11,26bc
Media		1,74b	9,70a

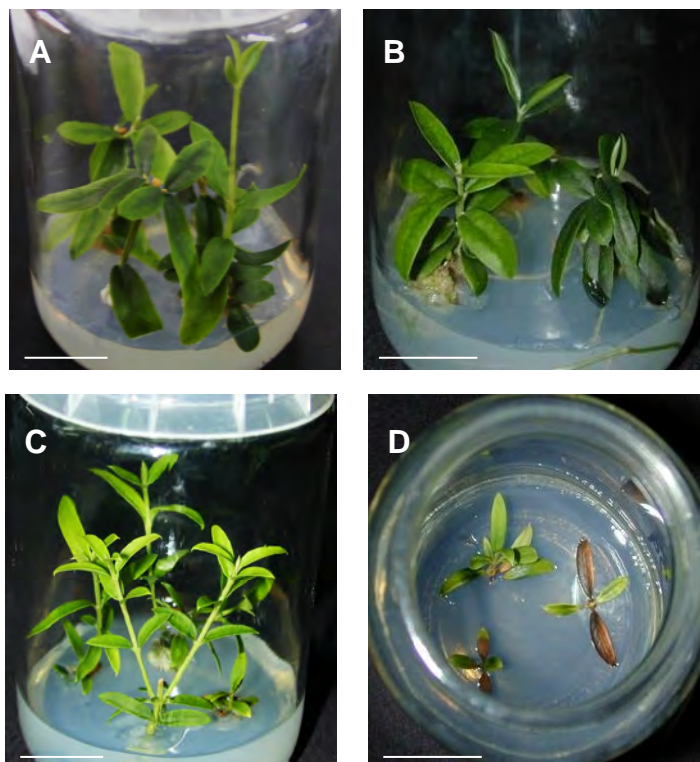


**Figura 14.** Brotes formados en medio de germinación a partir de ES procedentes de A) líneas antiguas (P5) y B) líneas jóvenes (T4). Barra = 1 cm.



### II.3.5. Multiplicación de brotes

Las plantas presentaron buen aspecto en medio de multiplicación, no observándose diferencias importantes debidas a la procedencia del brote, desarrollado a partir de ES o EZ, o a la edad del cultivo embriogénico. No obstante, se apreciaron diferencias en el vigor de las secciones nodales dependiendo de la línea de procedencia, especialmente entre P2 y T5 (Fig. 15).



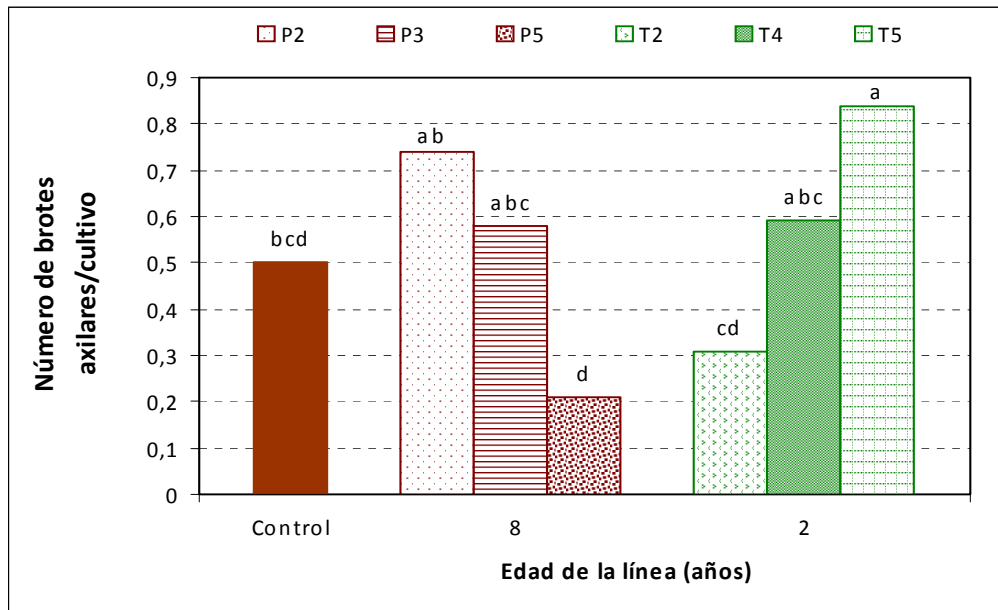
**Figura 15.** Aspecto general de plantas en medio de multiplicación: plantas procedentes de A) semillas y de las líneas B) P2, C) T5 y D) P5. Barra = 1 cm.

A lo largo de subcultivos sucesivos en medio de multiplicación fueron dándose casos de necrosis, fundamentalmente en la línea P5, que llegaron a provocar, en algunos casos, la pérdida de la planta (Fig. 15).

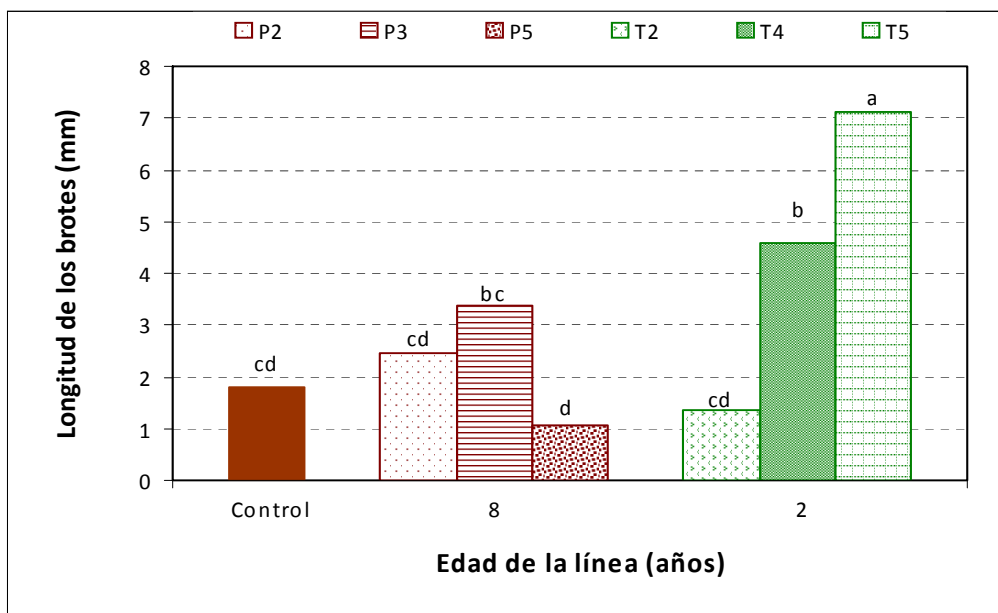
A pesar de la baja concentración de auxina utilizada en el medio de multiplicación, se observó en algunos casos la formación de callo y/o raíces. Este hecho fue mucho más frecuente en los brotes procedentes de líneas antiguas que en los obtenidos a partir de líneas jóvenes.

El número de brotes axilares formados estuvo determinado por el genotipo ( $P = 0,0017$ ) pero no por el tiempo que la línea se había sido mantenida en medio de proliferación (Fig. 16).

La longitud de los brotes axilares formados fue el único parámetro evaluado en la fase de multiplicación que se vio influenciado de forma significativa por la edad del cultivo ( $P = 0,0022$ ) además de por el genotipo ( $P = 0,0000$ ) (Fig. 17). Los brotes axilares desarrollados a partir de secciones de líneas jóvenes fueron significativamente más largos (4,35 mm) que los obtenidos a partir de secciones de líneas antiguas (2,29 mm). La variabilidad entre líneas fue muy grande con longitudes que oscilaron entre 7,13 mm, en la línea T5, y 1,05 mm, en la línea P5.



**Figura 16.** Efecto de la edad de la línea sobre el número de brotes axilares formados por cultivo en medio de elongación. Comparación con plantas control procedentes de EZ.



**Figura 17.** Efecto de la edad de la línea sobre la longitud de los brotes axilares obtenidos en medio de elongación. Comparación con plantas control procedentes de EZ.

Los resultados obtenidos permitieron diferenciar líneas con diferente vigor en la fase de multiplicación. Mientras que las plantas obtenidas a partir de la línea T5 presentaron mayor cantidad de brotes axilares, que además eran de mayor longitud, las líneas P5 y T2 se caracterizaron por presentar menos brotes y de menor longitud. P5 y T2 presentaron también tallos de mayor grosor y entrenudos más cortos que T5, que se caracterizó por presentar tallos finos y entrenudos largos.



### II.3.6. Enraizamiento de brotes

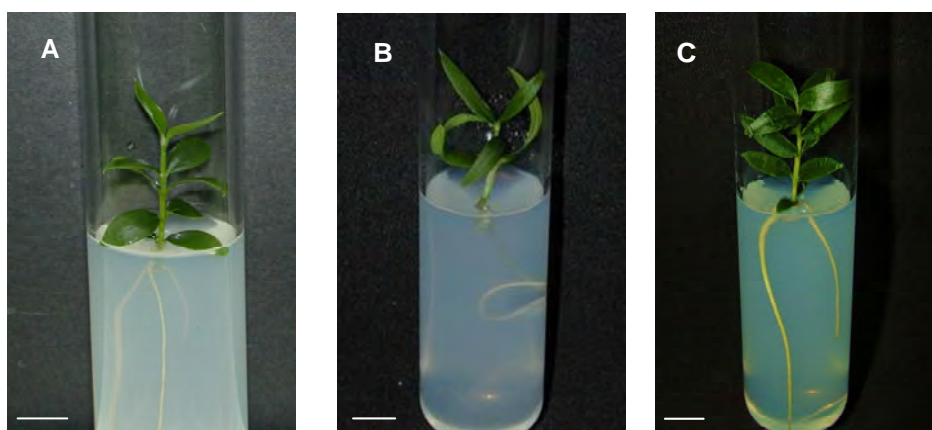
En este experimento se estudió el efecto del genotipo y la edad del cultivo sobre la capacidad de enraizamiento de los brotes obtenidos durante la fase de germinación.

Las primeras raíces aparecieron después de 8-10 días en medio de enraizamiento, aunque pudo observarse que los brotes procedentes de líneas antiguas enraizaron un poco más tarde que los obtenidos a partir de líneas jóvenes o semillas. Durante el proceso de enraizamiento se apreció en algunos casos la formación de callo en la base del tallo (Fig. 18). No obstante, todas las plantas mostraron buen aspecto, con formación de un sistema radicular bien desarrollado (Fig. 19).

Los porcentajes de enraizamiento oscilaron entre el 83,33 y el 100%, no observándose diferencias significativas entre las líneas testadas, ni respecto a las plantas control, procedentes de semillas (datos no mostrados). Tampoco pudo observarse un efecto significativo de la edad del cultivo, con una tasa de enraizamiento del 87,88% para las líneas jóvenes y del 92,59% para las más antiguas. Las plantas procedentes de EZ enraizaron en el 100% de los casos.



**Figura 18.** Formación de callo en una planta somática en medio de enraizamiento. Barra = 1 cm.

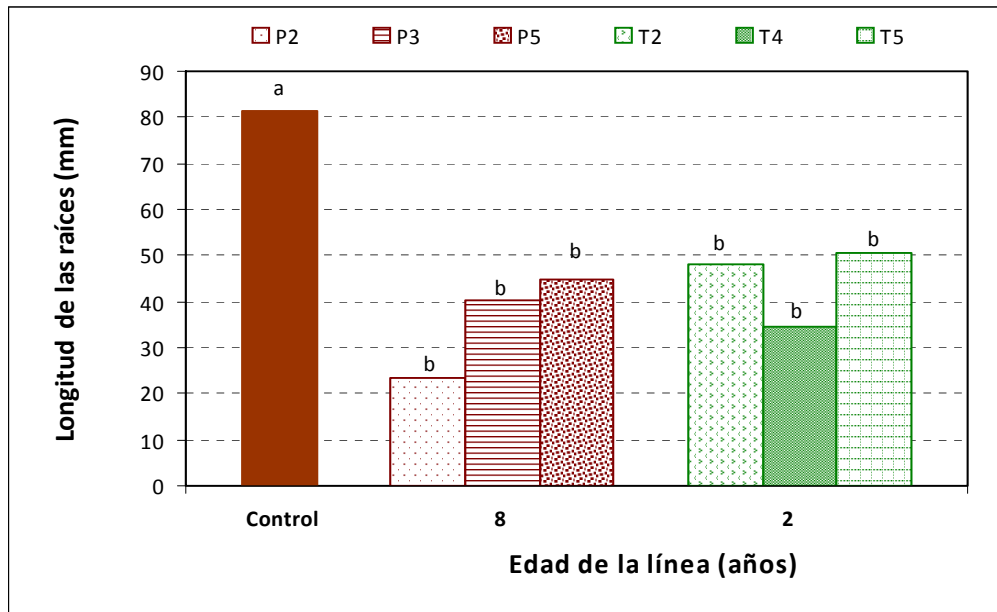


**Figura 19.** Aspecto general de plantas de olivo en medio de enraizamiento: A) Planta control procedente de semilla, B) planta obtenida a partir de una línea antigua (P5) y C) planta obtenida a partir de una línea joven (T4). Barra = 1 cm.

El número de raíces tampoco se vio afectado de forma significativa por el genotipo o la

edad del cultivo (datos no mostrados). En los brotes procedentes de ES, el número de raíces osciló entre 2,11 y 3,00, mientras que en los procedentes de EZ se obtuvieron valores intermedios (2,62).

En lo que se refiere a la longitud de las raíces, tampoco se apreciaron diferencias significativas entre las líneas embriogénicas testadas, con valores comprendidos entre 23,50 y 50,70 mm (Fig. 20). No obstante, las raíces desarrolladas a partir de brotes procedentes de ES fueron siempre más cortas que las obtenidas a partir de tallos procedentes de semillas (81,21 mm).

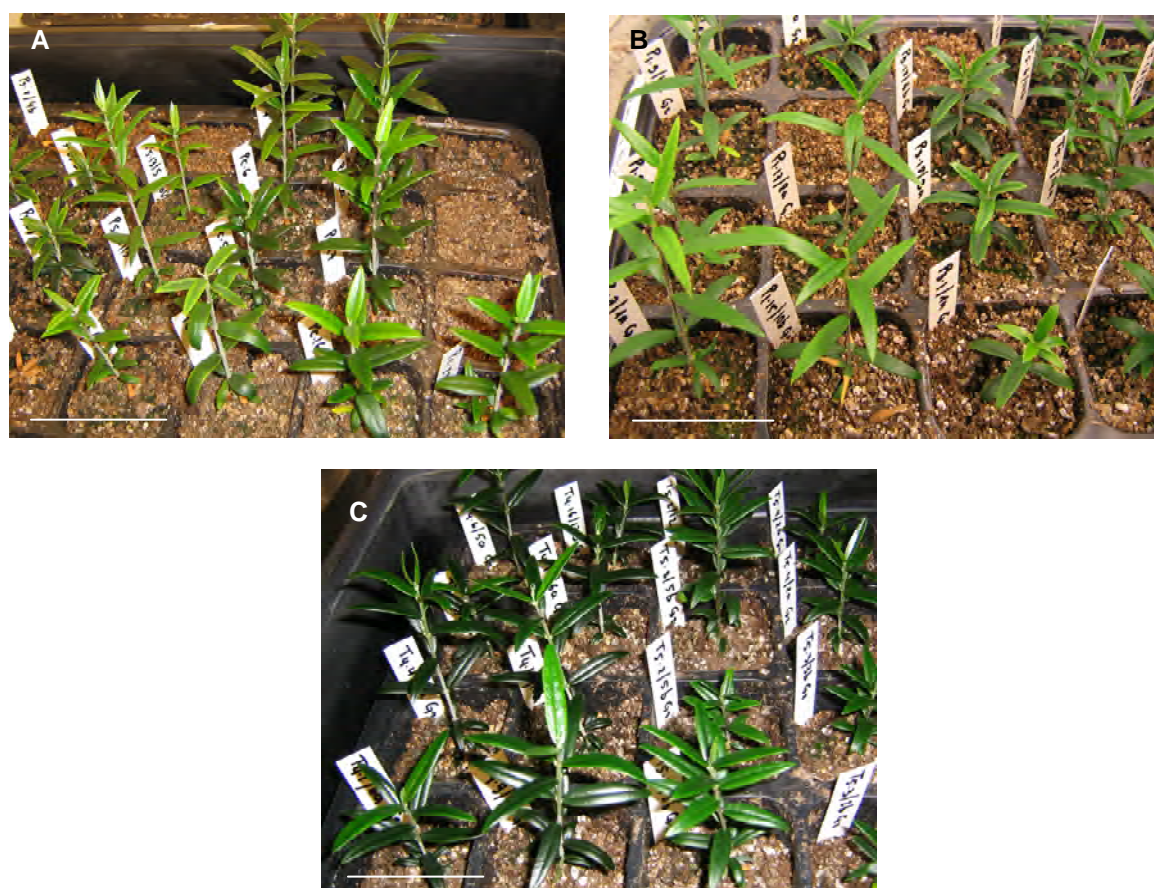


**Figura 20.** Efecto de la edad de la línea sobre la longitud de las raíces desarrolladas en medio de enraizamiento. Comparación con plantas control procedentes de EZ.

### II.3.7. Aclimatación

Durante la fase de aclimatación las plantas procedentes de ES mostraron buen aspecto y un crecimiento similar al de las plantas procedentes de EZ (Fig. 21).

En lo que se refiere a la tasa de supervivencia después de 8 semanas, el análisis estadístico no puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre genotipos diferentes. Las plantas de todas las líneas, independientemente también de la edad de las mismas, se adaptaron bien a las condiciones *ex vitro*, con tasas de supervivencia muy elevadas (80–100%), similares a las obtenidas en las plantas control (100%) (datos no mostrados).



**Figura 21.** Aspecto general de plantas de olivo en fase de aclimatación. A) Plantas controles procedentes de EZ. B) y C) plantas procedentes de ES. Barra = 5 cm.

## II.4. Discusión

### II.4.1. Proliferación de cultivos embriogénicos

Durante la fase de proliferación, las células embriogénicas deben mostrar una capacidad continua de proliferación, que permitirá el mantenimiento de los cultivos.

Los cultivos embriogénicos de olivo presentaron diferencias morfológicas importantes dependiendo de la línea. Resultados similares han sido descritos en otras especies como aguacate (Witjaksono *et al.* 1999) y pino marítimo (Breton *et al.* 2006). El genotipo es uno de los factores que no solo determina si un cultivo continúa siendo embriogénico o no, sino que también afecta a las características de los ciclos repetitivos (Merkle 1995). Además, parece ser responsable de controlar el estado de desarrollo del ES en el que tiene lugar la proliferación de nuevo material embriogénico (Merkle 1995). En general, los genotipos de olivo estudiados mostraron una forma de proliferación basada en la formación de callo embriogénico y ES de diferente tamaño, observándose una forma de embriogénesis secundaria repetitiva, caracterizada por la proliferación de nuevo material embriogénico sobre embriones primarios, similar a la descrita en otras especies (Witjaksono y Litz 1999).

La morfología de los cultivos pareció verse afectada por el tiempo en proliferación. En general, el mantenimiento de líneas embriogénicas de olivo en proliferación continua durante un periodo prolongado de tiempo provocó un deterioro de la calidad del tejido, aunque el efecto fue variable dependiendo del genotipo. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos en los que también se observó un cambio en el aspecto de los cultivos embriogénicos a lo largo del tiempo. En palma de aceite (Konan *et al.* 2010) y zanahoria (Molle *et al.* 1993), el mantenimiento de los cultivos a largo plazo mediante subcultivos repetitivos condujo a una reducción gradual de la calidad de los mismos. En aguacate, Perán-Quesada (2001) observó que el mantenimiento de los cultivos a largo plazo daba lugar a un aumento del crecimiento desorganizado y a una pérdida del potencial de regeneración. Los cultivos embriogénicos de pino marítimo también cambiaron de morfotipo y color con el tiempo. Observaciones a nivel microscópico pusieron de manifiesto que en cultivos jóvenes las masas embrión-suspensor estaban compuestas por grandes agrupaciones de células pequeñas e intensamente teñidas, que formaban cabezas embrionarias bien definidas o masas lobuladas como resultado de procesos de rotura o proliferación. La organización celular de las masas embrión-suspensor se deterioró con el tiempo de manera que los embriones bien formados fueron progresivamente reemplazados por pequeñas agrupaciones de células meristemáticas laxamente unidas (Breton *et al.* 2006). En olivo, también se ha descrito un aumento de la desorganización de las PEMs después de un año de proliferación (Shibli *et al.* 2001).

En lo que se refiere a la tasa de proliferación de los cultivos, los resultados obtenidos pusieron de manifiesto un efecto significativo tanto del genotipo como de la edad del cultivo, con incrementos de peso más elevados en los cultivos mantenidos durante más tiempo.

Estudios previos señalaron al genotipo como uno de los factores que determinan la tasa de proliferación de los cultivos (Merkle 1995). Resultados que corroboran esta afirmación se han obtenido en diferentes especies como abeto rojo (Becwar *et al.* 1987), pino marítimo (Breton *et al.* 2005) o *Kalopanax septemlobus* (Park *et al.* 2011).

El efecto de la edad del cultivo sobre la tasa de crecimiento también ha sido descrito en otras especies como *Kalopanax septemlobus* (Park *et al.* 2011) o *Persea americana* (Márquez-Martín 2007), en las que se observaron tasas de proliferación más elevadas en los cultivos mantenidos durante más tiempo.

A pesar de que el mantenimiento de los cultivos embriogénicos de olivo se llevó a cabo en medio con auxina, se observó la producción de ES en distintos estados de desarrollo. La auxina es una hormona indispensable para la proliferación de cultivos embriogénicos, pero también es un inhibidor de la formación de ES (Nomura y Komamine 1985; De Vries *et al.* 1988; Filonova *et al.* 2000). Según von Arnold (2008), el agotamiento de la auxina en el medio de cultivo comienza algunos días después del inicio del cultivo. Como consecuencia, si los cultivos no son transferidos a medio fresco semanalmente, los ES pueden comenzar a desarrollarse.

Al igual que en *Glycine max* (Bailey *et al.* 1993), el desarrollo de ES en medio de mantenimiento se vio significativamente afectado por la línea embriogénica. Sin embargo, no se observó un efecto del tiempo de cultivo sobre el número total de ES producidos por cultivo.

No obstante, los resultados de producción de ES en diferentes etapas de desarrollo pusieron de manifiesto diferencias en el patrón de proliferación de los cultivos embriogénicos de olivo como consecuencia del tiempo en proliferación, con mayor producción de embriones en estadios avanzados en los cultivos que habían sido mantenidos en proliferación durante menos tiempo. Estos resultados están de acuerdo con Molle *et al.* (1993) quienes, en cultivos embriogénicos de zanahoria, observaron una disminución de la calidad de los embriones en función del tiempo de cultivo. En palma de aceite también se apreció una reducción gradual de la calidad de los ES después de nueve años de cultivo (Konan *et al.* 2010). No obstante, el deterioro en la calidad de los tejidos no afectó por igual a todos los clones testados, manteniendo algunas líneas intactos su potencial de multiplicación y de regeneración de plantas (Konan *et al.* 2010).

Los datos de formación de ES obtenidos en la presente investigación junto con los de crecimiento podrían poner de manifiesto, tal como propusieron Breton *et al.* (2005), una asociación entre una organización compleja de los cultivos y una baja tasa de crecimiento. Además, los resultados revelan que el mantenimiento *in vitro* de cultivos embriogénicos mediante subcultivos repetitivos durante periodos de tiempo prolongados provoca un descenso gradual de la organización celular del cultivo, aumentando así, como propone von Arnold (2008), la posibilidad de una disminución del potencial embriogénico.

#### II.4.2. Desarrollo y maduración de ES

La producción de ES durante la fase de desarrollo varió dependiendo de la línea embriogénica, con algunos genotipos que produjeron un número elevado de embriones mientras que en otros la producción fue muy baja. En general, el genotipo representa uno de los factores responsables de las variaciones observadas durante el desarrollo y maduración de ES (Merkle *et al.* 1995). Resultados similares se han observado en otras especies como el aguacate. En este cultivo, mientras que las líneas tipo SE responden positivamente a los tratamientos de maduración, las líneas tipo PEM raramente se diferencian en ESBO en las condiciones estándar de maduración (Márquez-Martín *et al.* 2012). En coníferas como *Pinus pinaster* (Lelu-Walter *et al.* 2006) o *Picea abies* (Egertsdotter y von Arnold 1998) también se han descrito diferencias en la producción de embriones debidas al genotipo.

El tiempo de cultivo afectó de forma negativa a la formación en medio de desarrollo de ES de olivo. De acuerdo con von Arnold (2008), los cultivos embriogénicos de algunos genotipos pueden ser subcultivados y mantenidos en medio con reguladores de crecimiento durante un periodo prolongado de tiempo manteniendo su capacidad de producir ES maduros. Sin embargo, el riesgo de disminución del potencial de regeneración aumenta con el tiempo de cultivo en medio de mantenimiento.

En general, después del inicio del cultivo, existe un periodo corto (uno o varios



subcultivos) durante el cual la tasa de regeneración aumenta (Reinert y Backs 1968; Reinert *et al.* 1971). A este le sigue un periodo de alta capacidad regenerativa, después del cual, la capacidad de los tejidos para regenerar embriones maduros generalmente disminuye (von Arnold, 2008).

En cultivos nucelares de *Citrus sinensis* se observó una disminución del potencial embriogénico a lo largo de subcultivos sucesivos (Kochba *et al.* 1972; Bhojwani *et al.* 1996). Esta pérdida de la capacidad morfogénica al aumentar el tiempo de cultivo ha sido descrita también en pino marítimo por Breton *et al.* (2005) y Klimaszewska *et al.* (2009), quienes apreciaron un descenso en la producción de ES maduros en tejidos embriogénicos cultivados durante más de un año.

En coníferas se ha demostrado que la composición celular y la presencia de ES en estadios tempranos de desarrollo pueden variar con la duración del cultivo (Breton *et al.* 2005). La pérdida de potencial morfogénico de una línea inicialmente productiva se ha asociado en este caso con un cambio en la morfología de los ES y en la composición y organización de los cultivos (Breton *et al.* 2005).

En *Kalopanax septemlobus* también disminuyó considerablemente la capacidad para formar ES en medio de maduración con la edad del callo, aunque los cultivos mantuvieron una apariencia embriogénica en todos los casos. Según Park *et al.* (2011), sería necesario investigar si estas diferencias están relacionadas con un descenso de la actividad metabólica del cultivo.

Breton *et al.* (2006) describieron en sus trabajos un efecto negativo de los subcultivos repetitivos sobre el desarrollo de embriones en estado cotiledonar. Según estos autores, este efecto era consecuencia de una parada o asincronía en el desarrollo del embrión o a haber seguido un patrón de diferenciación erróneo.

En general, las razones para la pérdida de capacidad regenerativa son todavía inciertas y pueden variar dependiendo de las circunstancias. No obstante, diferentes hipótesis se han planteado para intentar explicar este hecho (Gahan y George 2008):

- Variación genética en la población celular: Una teoría muy extendida es que durante los subcultivos, las células son preferentemente seleccionadas por su habilidad para proliferar más rápidamente bajo las condiciones de cultivo elegidas y que este atributo es incompatible con la capacidad de regeneración (Sacristan y Melchers 1969; Smith y Street 1974; Orton 1980).
- Presencia de sustancias que provocan la regeneración, que están presente en el explanto fresco y disminuyen lentamente durante el mantenimiento *in vitro* (Reinert y Backs 1968). La hipótesis opuesta podría ser la presencia de un inhibidor de la regeneración, que va acumulándose con el tiempo.
- Cambios epigenéticos en los cultivos celulares: El genotipo de estas células esencialmente se conserva, pero los mecanismos reguladores de la información genética, que gobiernan la regeneración, se vuelven inoperantes o se pierden durante los subcultivos (Rice *et al.* 1979).

De acuerdo con Gahan y George (2008), estas hipótesis representan dos ideas: que las células no competentes han perdido permanentemente su totipotencia o que la competencia morfogenética se ha visto dañada.

Según William y Maheswaran (1986), el patrón observado en la embriogénesis somática depende de si un grupo de células mantiene un funcionamiento coordinado como una unidad embriogénica y, en consecuencia, es afectado por factores que infuyen en la comunicación intercelular. En alfalfa, Cvikrová *et al.* (1991) encontraron que una característica de los cultivos

después de la pérdida de potencial embriogénico era un aumento en los niveles de ácidos fenólicos con grupos metilo. En cultivos de callo de arroz mantenidos a largo plazo, la regeneración se vio afectada por la acumulación de poliaminas (Bajaj y Rajam 1996).

Además de en el número total de embriones producidos, en el presente trabajo también se observaron diferencias en el tipo de embriones desarrollados a partir de líneas de edades diferentes. Los resultados mostraron que la mayor producción de ES observada en los cultivos jóvenes se debió principalmente a un mayor desarrollo de  $ESTr \geq 5$  mm y  $ESBO < 5$  mm. Globalmente, las líneas jóvenes parecen tener un potencial morfogénico mayor, siendo capaces de producir embriones en estadios de desarrollo más avanzados.

El paso de una fase de proliferación no organizada a otra de desarrollo embriogénico organizado, se ha propuesto que juega un papel fundamental en la embriogénesis somática (Filonova *et al.* 2000), con experimentos de desarrollo dinámicos realizados con cultivos embriogénicos de abeto rojo que refuerzan la importancia de la transición PEM-embrión (Bozhkov *et al.* 2002). En los cultivos antiguos de olivo, sin embargo, no se observa una disminución en el desarrollo de embriones en estadios tempranos de desarrollo. Los cambios en la producción de ES solo afectan a los estadios más avanzados.

#### II.4.3. Germinación de ES

Los resultados obtenidos mostraron una influencia significativa del genotipo sobre la capacidad de germinación de los ES de olivo. En *Psidium guajava*, Akhtar (1997) también observó una variación en la capacidad de germinación de embriones procedentes de cultivos embriogénicos genéticamente distintos.

El tiempo de cultivo de las líneas embriogénicas también tuvo un efecto significativo sobre la capacidad de germinación de los ES obtenidos, con tasas más elevadas en los embriones procedentes de las líneas jóvenes. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos en pino marítimo en los que también se apreció una influencia negativa de los subcultivos repetidos en el tiempo sobre la tasa de germinación de los embriones (Breton *et al.* 2006). En líneas embriogénicas de la misma edad, Park *et al.* (2011) encontraron una correlación directa entre la formación de ES y la conversión de estos en plántulas. Sin embargo, cuando compararon la obtención de plántulas a partir de ES procedentes de cultivos del mismo genotipo mantenidos durante dos periodos de tiempo diferentes (6 meses y 2,5 años), observaron que la tasa de conversión más elevada se obtenía en los ES procedentes de los cultivos más jóvenes, lo que ponía de manifiesto que no solo la producción de ES disminuía con la edad, sino también la conversión de estos en plantas.

Además, los embriones procedentes de cultivos mantenidos durante periodos prolongados a menudo dieron lugar a una germinación aberrante (Parrot *et al.* 1988; Roberts *et al.* 1990; Senaratna *et al.* 1990). La capacidad de germinación de un embrión depende de un desarrollo embrionario correcto, de manera que el embrión formado no presente malformaciones anatómicas que impidan su posterior conversión en planta, y de que la acumulación de sustancias de reserva haya sido adecuada, para que durante la germinación el embrión disponga de los compuestos necesarios para la formación de la plántula, hasta el desarrollo de la autotrofia (Sánchez-Romero *et al.* 2002). Estos procesos, que tienen lugar durante el desarrollo y maduración del embrión, no parecen ocurrir del mismo modo en líneas de edades diferentes, ya que los embriones desarrollados a partir de líneas mantenidas en proliferación durante más tiempo germinaron con tasas significativamente más bajas. Estudios adicionales podrían ayudar a esclarecer qué mecanismos o procesos no ocurren de forma correcta en los cultivos procedentes de líneas antiguas.

#### II.4.4. Potencial de regeneración

Tanto el genotipo como la edad del cultivo mostraron una influencia significativa sobre el potencial de regeneración de cultivos embriogénicos de olivo. El genotipo también tuvo en *Glycine max* una influencia importante en la eficiencia de regeneración vía embriogénesis somática (Komatsuda y Ohyama 1988; Komatsuda *et al.* 1992). De acuerdo con Bailey *et al.* (1993), el genotipo puede tener una influencia decisiva en la aplicabilidad de la embriogénesis somática como método de regeneración de plantas. No obstante, el efecto del genotipo puede ser parcialmente superado mediante modificaciones del protocolo de partida.

En general, el tiempo de cultivo en medio de mantenimiento mediante subcultivos repetitivos afecta de forma negativa al potencial de regeneración de los cultivos (Breton *et al.* 2006), como consecuencia normalmente de deficiencias durante las fases de desarrollo y maduración del embrión. Las plántulas obtenidas también fueron significativamente diferentes dependiendo de la edad del cultivo. En general, los ES procedentes de cultivos mantenidos en proliferación durante 8 años dieron lugar a más tallos por ES germinado, pero de menor longitud que los embriones procedentes de líneas jóvenes. Estos resultados están de acuerdo con observaciones previas en las que embriones procedentes de cultivos mantenidos durante periodos prolongados de tiempo a menudo dieron lugar a una germinación aberrante, así como a un crecimiento poco vigoroso (Parrot *et al.* 1988; Roberts *et al.* 1990; Senaratna *et al.* 1990). Según Merkle *et al.* (1995), la menor longitud del hipocótilo observada en las líneas antiguas puede ser debida a un agotamiento rápido de las reservas presentes en los ES.

#### II.4.5. Multiplicación de brotes

La multiplicación *in vitro* de las plantas obtenidas de la germinación de ES se vio afectada de forma importante por el genotipo, con algunas líneas en las que este proceso tenía lugar muy eficientemente y otras en las que la tasa de multiplicación fue muy baja.

Estudios previos llevados a cabo en olivo han puesto de manifiesto la existencia de dificultades en la multiplicación *in vitro* de esta especie y heterogeneidad en la respuesta de diferentes cultivares (Rugini y Fontanazza, 1981; Bartolini *et al.*, 1990; Leva *et al.*, 1992; García-Férriz *et al.*, 2002). Las diferencias observadas entre las líneas testadas podría deberse a que el medio de cultivo (Revilla *et al.* 1996) y las condiciones utilizadas para la multiplicación no se adecúen a todos los genotipos, limitando así la multiplicación *in vitro* de las plantas obtenidas vía embriogénesis somática a partir de líneas de origen diferente. Una optimización de las condiciones de micropropagación de forma específica para los casos más problemáticos podría ayudar a superar este inconveniente.

La edad de los cultivos a partir de los cuales se regeneraron las plantas solo influyó en la longitud de los brotes obtenidos, con tallos significativamente más largos en las plantas procedentes de líneas jóvenes. Este efecto podría estar relacionado con el vigor de las plántulas obtenidas durante la germinación de los ES, significativamente mayor cuando estos proceden de cultivos mantenidos durante menos tiempo. Este resultado está de acuerdo con Rugini y Baldoni (2005), quienes apuntan que el éxito de la multiplicación *in vitro* de olivo está relacionado con el vigor del crecimiento de la planta madre.

#### II.4.6. Enraizamiento de brotes

El enraizamiento de los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación tuvo lugar con éxito, con porcentajes que oscilaron entre el 83,33 y el 100%. Ni el genotipo ni la edad del cultivo tuvieron un efecto significativo sobre la capacidad de enraizamiento. Sin embargo, la



formación de raíces adventicias *in vitro* es todavía difícil en muchos cultivares de olivo (Briccoli-Bati *et al.*, 1999; Rugini *et al.*, 1999). De hecho, Rugini (1984), Fiorino y Leva (1986) y Rama y Pontikis (1991), obtuvieron tasas de enraizamiento *in vitro* que oscilaron entre el 25 y el 85%, dependiendo del cultivar utilizado.

El número de raíces y la longitud de las mismas tampoco se vieron afectados por el genotipo o la edad del cultivo, obteniéndose normalmente un sistema radicular adecuado. No obstante, la capacidad para obtener plantas enraizadas *in vitro* no es siempre un indicador de que el crecimiento va a continuar en el tiempo (Anandarajah *et al.* 1990a, b; Fujii *et al.* 1990; Senaratna *et al.* 1990) o de que va a tener lugar con éxito en condiciones *ex vitro*. Esto debe ser evaluado durante la fase de aclimatación.

#### II.4.7. Aclimatación

Durante la fase de aclimatación, las plantas obtenidas vía embriogénesis somática mostraron un aspecto normal y un crecimiento rápido, a pesar de perder las primeras hojas. En muchas especies vegetales, las hojas formadas *in vitro* son incapaces de continuar desarrollándose en condiciones *ex vitro* y son reemplazadas por hojas formadas en estas nuevas condiciones (Preece y Sutter 1991; Diettrich *et al.* 1992). Según Grout y Millam (1985), esto puede ser debido a que las sales y sustancias orgánicas almacenadas en las primeras hojas, no funcionales, son utilizadas para el crecimiento y desarrollo de nuevos órganos durante la fase de aclimatación. Las hojas formadas después de la aclimatación suelen mostrar un aspecto y una función fotosintética normales (Deng y Donnelly 1993).

Estadísticamente, la tasa de supervivencia de las plantas en la fase de aclimatación fue alta y no se vio afectada por el genotipo ni por la edad de la línea. Resultados similares se han obtenido en olivo en otros casos. Así, Cañas y Benbadis (1988) describieron tasas de supervivencia del orden del 75-80% en plantas de olivo regeneradas vía organogénesis adventicia a partir de callos inducidos de fragmentos de cotiledones. Menuccini y Rugini (1993) también aclimataron plantas de olivo obtenidas vía organogénesis adventicia a partir de peciolo de hojas. En lo que se refiere a plantas obtenidas vía embriogénesis somática, Shibli *et al.* (2001) obtuvieron un porcentaje de supervivencia elevado (95%) en plantas de olivo regeneradas de callos inducidos a partir de diferentes tipos de explantos (hojas, peciolo, hipocótilo y raíces de semillas germinadas).



## **CAPÍTULO III. CRIOCONSERVACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS**



### III.1. Introducción

La crioconservación se considera el único método disponible para el almacenamiento a largo plazo seguro de material vegetal (Engelmann 2011). Esta técnica consiste en el almacenamiento de material biológico a una temperatura muy baja, como la del nitrógeno líquido (NL) (-196°C) (Withers y Engelmann 1997). A esta temperatura ultrabaja todos los procesos metabólicos y la mayoría de los procesos físicos se detienen, permitiendo la conservación del material vegetal durante un periodo de tiempo teóricamente ilimitado (Engelmann 2004), evitando las desventajas del mantenimiento *in vitro* (Reed 2008).

El uso integrado de la embriogénesis somática y la crioconservación permite la conservación eficiente de clones de interés, genotipos élite, líneas celulares con atributos especiales y material transgénico hasta que los resultados de los experimentos de campo estén disponibles (Engelmann 1992; Lynch 2000). En definitiva, la crioconservación constituye un medio para facilitar el manejo de material de interés biotecnológico.

#### III.1.1. Técnicas de crioconservación

Durante la crioconservación, al igual que en cualquier proceso de congelación, se originan cristales de hielo, que son considerados la principal causa de muerte celular debido al daño físico que causan en las membranas (Helliot *et al.* 2003).

La mayoría de los sistemas experimentales empleados en crioconservación contienen grandes cantidades de agua celular libre y son extremadamente sensibles a los daños por congelación, ya que la mayoría de ellos no toleran este proceso de manera innata. Para mantener la viabilidad celular es importante evitar la congelación intracelular (Sakai y Yoshida 1967). Por lo tanto, las células necesitan ser suficientemente deshidratadas artificialmente antes de su inmersión en NL. Las técnicas empleadas y los mecanismos físicos en los que estas se basan son diferentes dependiendo del método de crioconservación (Withers y Engelmann 1998). Mientras que las técnicas clásicas implican la deshidratación inducida por congelación, las más modernas están basadas en la vitrificación (Engelmann 2004).

##### III.1.1.1. Técnicas clásicas

Los métodos clásicos, también conocidos como congelación en dos fases, congelación lenta o congelación a velocidad controlada, fueron los primeros que se desarrollaron. Estos métodos consisten en el enfriamiento lento de los explantos hasta una temperatura de precongelación determinada, seguido de inmersión rápida en NL. De forma general, las muestras son pretratadas con soluciones crioprotectoras compuestas por una o varias sustancias químicas, las cuales usualmente se añaden de forma progresiva hasta una concentración final. Este pretratamiento retira parte del agua de las células. Sin embargo, la mayoría del agua se retira durante el primer paso de enfriamiento, es decir, durante la congelación lenta hasta -35 ó -40°C. En el punto de congelación de la solución crioprotectora se inicia la nucleación del hielo, formándose hielo en la solución crioprotectora y en los espacios intercelulares. Ya que solo una parte del agua que contribuye a la solución extracelular sufre la transición a hielo, la solución se vuelve cada vez más concentrada. Para restaurar el equilibrio osmótico, el agua abandona el protoplasto, lo que da lugar a una reducción del agua intracelular congelable y a un aumento de la concentración de solutos en el interior de la célula. Esto último provoca una disminución de la temperatura de cristalización de la solución intracelular residual, que formará hielo a una temperatura más baja o, si está suficientemente concentrada, formará un cristal vítreo en contacto con el NL (Panis 1995; Reed y Uchendu

2008). Así, el citoplasma permanece descongelado debido a la concentración de solutos y la pared celular protege la membrana celular del daño causado por los cristales de hielo. La velocidad de enfriamiento lento usualmente utilizada para garantizar un nivel apropiado de deshidratación de los explantos suele ser de  $0,5-2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ .

Las técnicas clásicas son, en general, complejas y en muchos casos requieren el uso de congeladores programables sofisticados y caros (Kantha y Engelmann 1994; Engelmann 1997b). Estas técnicas dan mejores resultados cuando se utilizan materiales indiferenciados como callos o suspensiones celulares (Heine-Dobbernack *et al.* 2006; 2007). No obstante, también han sido empleadas para la congelación de estructuras diferenciadas, como ápices de especies tolerantes al frío (Reed y Chang 1997).

Los procedimientos de congelación clásica incluyen las siguientes etapas: precultivo de los explantos, crioprotección, enfriamiento lento hasta una temperatura determinada de precongelación (usualmente  $-40^{\circ}\text{C}$ ), inmersión rápida en NL, descongelación rápida y recuperación del cultivo (Engelmann 2011).

### III.1.1.2. Técnicas basadas en la vitrificación

En estas técnicas se elimina la formación de hielo dentro y fuera de las células gracias al proceso de vitrificación.

La vitrificación es un proceso físico que se define como la solidificación no cristalina de líquidos. En el caso del agua, este proceso implica la transición de la fase líquida, directamente y sin formación de cristales de hielo (Fahy *et al.* 1984), a un estado amorfo o vítreo que carece de una estructura organizada, pero que posee las propiedades mecánicas y físicas de un sólido (Taylor *et al.* 2004). La vitrificación del agua en los sistemas biológicos es dependiente de un aumento de la viscosidad celular. Esta elevada viscosidad no permite la reorganización molecular y, por lo tanto, impide la unión de las moléculas de agua para formar hielo (Benson 2008). El aumento de la viscosidad celular se puede conseguir a través de dos aproximaciones distintas: 1) la adición de aditivos crioprotectores a alta concentración, que penetran en el interior de la célula, y 2) la retirada de agua mediante deshidratación osmótica o desecación por aire o agentes desecantes (Benson 2008).

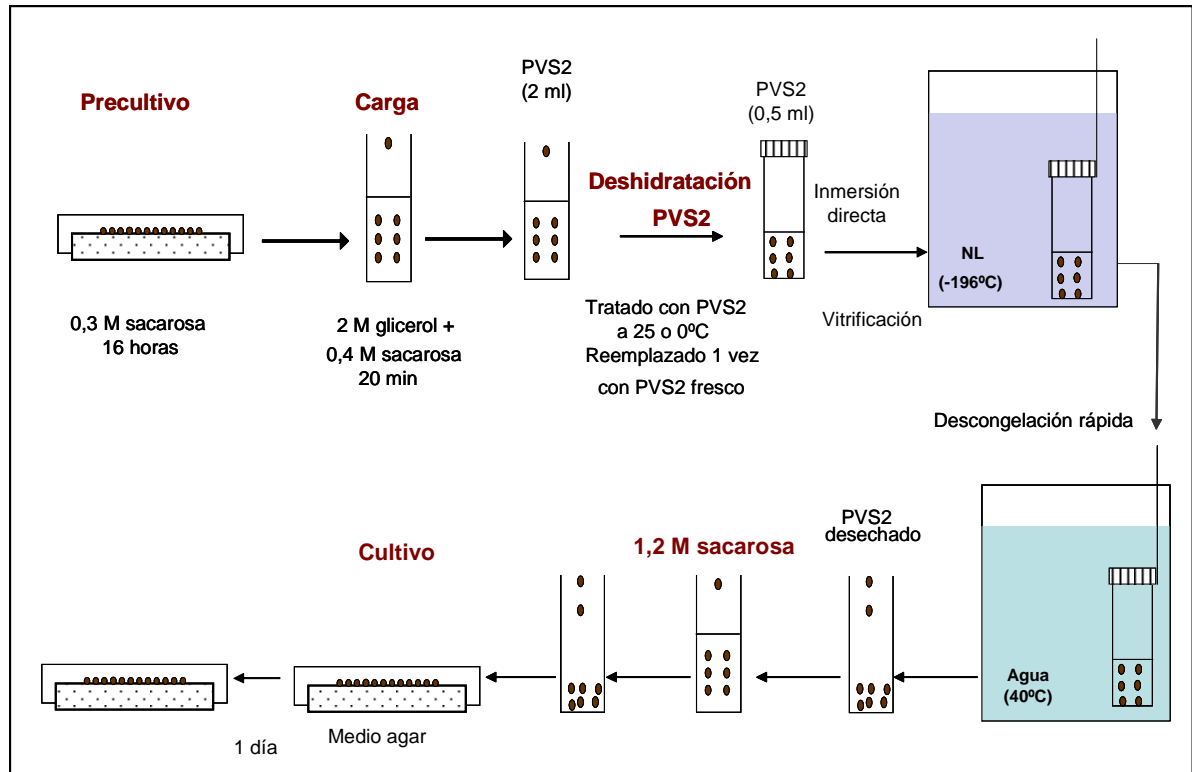
De esta forma, cuando una solución suficientemente concentrada se enfría a temperaturas muy bajas, pasa a un estado solidificado pero sin la formación de cristales de hielo. El estado vitrificado es metastable, lo que significa que puede ser revertido de forma relativamente fácil a líquido o desvitrificarse para formar hielo (Benson 2008). Los sistemas vitrificados son particularmente inestables durante la descongelación ya que pequeños cambios en la energía y movilidad de las moléculas pueden ser suficientes para permitir la reorganización de las moléculas de agua y la formación de cristales de hielo (Benson 2008).

De modo general se acepta que el paso crítico para conseguir supervivencia después de la crioconservación mediante protocolos basados en la vitrificación reside en la deshidratación y no la congelación (Ramon *et al.* 2002).

Las técnicas basadas en la vitrificación se han utilizado en la crioconservación de tejidos heterogéneos y complejos para los que es difícil conseguir velocidades óptimas de enfriamiento (Benson 2008).

### ▪ Fases de los métodos basados en la vitrificación

La mayoría de las técnicas de vitrificación clásicas comprende una serie de pasos comunes: preacondicionamiento de las muestras, osmoprotección o tratamiento de carga, deshidratación con una solución de vitrificación, inmersión en NL, descongelación, descarga y cultivo (Fig. 22).



**Figura 22.** Representación esquemática de un procedimiento de crioconservación basado en la vitrificación (tomado de Sakai (1995)).

#### ○ Estado fisiológico de los explantos

El estado fisiológico tiene un efecto importante en la manera en la que las diferentes células y tejidos sobreviven a los tratamientos crioprotectores (Benson 2008) y a la congelación. Este estado debe ser el óptimo para la adquisición de la máxima tolerancia a la deshidratación y para dar lugar a una recuperación vigorosa del crecimiento después de la congelación (Withers 1979; Dereuddre *et al.* 1988).

La respuesta de los explantos está influenciada por el tipo celular (Volk y Caspersen 2007) y la capacidad para superar el estrés (Benson *et al.* 1995).

#### ○ Preacondicionamiento

Ya que la fase crítica del proceso es la deshidratación, la clave para una crioconservación con éxito reside, en muchos casos, en la inducción de tolerancia a este proceso (Ramon *et al.* 2002). En la práctica, esta tolerancia se induce a través de diferentes tratamientos.

Una de las estrategias más utilizadas con esta finalidad ha sido el precultivo en altas concentraciones de sacarosa (Panis *et al.* 2002; Pinker *et al.* 2009). Los efectos de este tipo de tratamientos parecen darse a diferentes niveles: 1) Un efecto directo, induciendo vitrificación por sí mismos (Panis *et al.* 2005), 2) Un efecto protector estabilizando las membranas celulares

(Niu *et al.* 1997) y 3) un efecto a nivel fisiológico induciendo distintos tipos de cambios (Charoensub *et al.* 1999; Reinhoud *et al.* 2000; Jitsuyama *et al.* 2002).

La aclimatación al frío también se ha utilizado a menudo como una forma de mejorar la supervivencia a la crioconservación ya que aumenta la tolerancia a la deshidratación y a la congelación (Vandenbussche *et al.* 1999). En muchas especies, después de la aclimatación al frío, aumenta el nivel de insaturación de los ácidos grasos lo cual influye en las características de las membranas (Vandenbussche *et al.* 1999). También se ha observado un aumento en el contenido en azúcares, así como cambios en el estado físico del agua, que resultan en un ambiente celular menos sensible osmóticamente (Burchett *et al.* 2006).

También se han utilizado para mejorar la respuesta a la crioconservación tratamientos con agentes osmóticos o ABA (Ramon *et al.* 2002). La aplicación exógena de ABA o el incremento endógeno de este regulador de crecimiento en condiciones de estrés ha sido asociado con la síntesis de proteínas (Stewart y Voetberg 1985; Pelah *et al.* 1997) y otros solutos (Stewart y Voetberg 1985; Nieves *et al.* 2001) que juegan un papel importante en la tolerancia de las plantas a la desecación (Fang *et al.* 2004).

#### ○ Tratamiento de carga

Para muchas especies, la exposición directa a las soluciones vitrificantes, altamente concentradas, es tóxica. Es por esto que las muestras que van a ser crioconservadas deben ser previamente sometidas a un tratamiento de carga, que puede constituir un paso importante en los procedimientos basados en la vitrificación (Reed 2008).

En este tratamiento, los explantos son incubados en una solución crioprotectora con una concentración intermedia que recibe el nombre de solución de carga (LS). Esto prepara los explantos para su posterior exposición a la solución de vitrificación, reduciendo el choque osmótico que puede causar la exposición directa a la misma y provocando un aumento de la tolerancia a la deshidratación (Takagi 2000; Thin y Takagi 2000; Sakai 2004).

Entre las distintas soluciones LS testadas, una mezcla de glicerol 2 M y sacarosa 0,4 M demostró ser muy efectiva para inducir tolerancia a la deshidratación por incubación en una solución vitrificante (Sakai *et al.* 1991; Nishizawa *et al.* 1992). Normalmente, 20 min es un tiempo de incubación suficiente para reducir la toxicidad de la solución de vitrificación (Sakai *et al.* 1990) y mejorar la tolerancia al choque osmótico (Sakai 2004).

#### ○ Deshidratación con solución vitrificante

En este paso, los explantos deben ser deshidratados, normalmente mediante incubación con soluciones vitrificantes. Para que la crioconservación tenga éxito es fundamental conseguir durante este tratamiento un grado adecuado de desecación, evitando el daño por toxicidad química o estrés osmótico excesivo (Vujović *et al.* 2011). Así, optimizar el tiempo y la temperatura de exposición a las soluciones vitrificantes es fundamental para obtener tasas de recuperación elevadas después de la vitrificación (Sakai y Engelmann 2007). En algunos materiales es necesario llevar a cabo el tratamiento a 0°C para reducir los efectos perjudiciales de la solución de vitrificación (Nishizawa *et al.* 1993; Kuranuli y Sakai 1995; Thinh 1997; Yoon *et al.* 2006).

Se han desarrollado diferentes soluciones vitrificantes (Sakai *et al.* 1990; Steponkus *et al.* 1992). No obstante, las más usadas son las soluciones basadas en el glicerol “*Plant Vitrification Solution* (PVS) 2” (Sakai *et al.* 1990) y PVS3 (Nishizawa *et al.* 1993). La solución PVS2



contiene glicerol al 30% (p/v), etilenglicol al 15% (p/v), dimetil sulfóxido (DMSO) al 15% (p/v) y sacarosa 0,4 M (pH 5,8) mientras que la solución PVS3 consiste en glicerol al 50% (p/v) y sacarosa 1,46 M (Kulus y Zalewska 2012). Durante un enfriamiento rápido, la solución PVS2 se superenfía fácilmente por debajo de  $-100^{\circ}\text{C}$  y solidifica a  $-115^{\circ}\text{C}$ , dando un sólido no cristalino metaestable.

#### ○ Congelación y descongelación

Una alta velocidad de enfriamiento es esencial para conseguir la vitrificación durante la congelación y evitar así los efectos negativos de la formación de cristales de hielo (Panis *et al.* 2005). Es por esto que en las técnicas basadas en la vitrificación, la congelación se lleva a cabo en un solo paso, introduciendo directamente las muestras deshidratadas en NL (Panis *et al.* 2005), con lo que se consiguen velocidades de congelación de aproximadamente  $200^{\circ}\text{C min}^{-1}$  (Sakai y Engelmann 2007).

La fase de descongelación es igual de importante que la de congelación. La descongelación debe llevarse a cabo de forma rápida a temperatura controlada, para evitar los procesos potencialmente perjudiciales de desvitrificación y recrystalización del hielo (Wen *et al.* 1999; Benson *et al.* 2006). En general, independientemente del método de crioconservación utilizado, los crioviales se introducen en un baño de agua a  $35-42^{\circ}\text{C}$  (usualmente  $38^{\circ}\text{C}$ ) (Chen *et al.* 2011), lo que da lugar a una velocidad de descongelación de aproximadamente  $250^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Para aumentar la velocidad de calentamiento, el volumen de la solución PVS2 a menudo se reduce a 250 ó 500  $\mu\text{l}$  (Sakai y Engelmann 2007). La técnica de vitrificación en gota permite la descongelación en una solución de dilución (medio de cultivo con 1,2 M de sacarosa) a  $20-35^{\circ}\text{C}$  (Chen *et al.* 2011).

La descongelación lenta es generalmente menos eficiente, además de requerir más tiempo. No obstante, en técnicas basadas en la encapsulación, existen algunos protocolos con descongelación a temperatura ambiente (Kulus y Zalewska 2014).

#### ○ Recuperación del cultivo

La recuperación de explantos viables es el objetivo último de cualquier protocolo de crioconservación (Engelmann *et al.* 2008) y, por lo tanto, debe incluir unas condiciones adecuadas para el recrecimiento o recuperación del cultivo.

Después de la descongelación, la solución vitrificante debe ser retirada. Para ello se utiliza, durante 15-30 min, una solución de dilución, normalmente con un contenido menor de sacarosa para evitar el choque osmótico (Flachsland *et al.* 2006).

El medio de recuperación es un factor clave que puede determinar el éxito de la crioconservación. La rehidratación del material tiene lugar pocas horas después del cultivo en el medio de restauración (Bachiri *et al.* 1995). Para mejorar la penetración de los componentes nutricionales es recomendable que la incubación de los explantos descongelados se lleve a cabo en medio semisólido con baja concentración de agar (Kulus y Zalewska 2014).

Un problema importante de la crioconservación, observado muchas veces y aún no resuelto, es la falta de correlación entre la tasa de supervivencia y la de recrecimiento, ya que la combinación de parámetros de cultivo que garanticen las mayores tasas de supervivencia, no proporcionan necesariamente la mejor tasa de recrecimiento.

El criterio para evaluar la recuperación es variable, dependiendo del tipo de explanto utilizado para la crioconservación. Adicionalmente, en estudios sobre crioconservación se

utilizan diferentes tests para analizar la viabilidad celular. Los dos más utilizados son la tinción con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolium (TTC) (Stenpokus y Lamphear 1967) y la tinción con fluoresceína diacetato (FDA) (Widholm 1972; Whitters 1985).

El test con TTC se basa en la actividad respiratoria de las muestras testadas (Whitters 1985). El TTC es un compuesto incoloro. La reducción de una sal de tetrazolium por la acción de deshidrogenasas mitocondriales da lugar a la formación de formazan, un precipitado insoluble de color rojo intenso. Para una evaluación cuantitativa de la viabilidad celular, el precipitado rojo puede ser extraído con etanol, determinando su absorbancia espectrofotométricamente (Towill y Mazur 1975).

La FDA es un compuesto esterificado, apolar, que difunde libremente al interior de la célula (Rotman y Papermaster 1966). Una vez dentro de la misma, es hidrolizado por esterasas no específicas, dando lugar a fluoresceína libre, que emite fluorescencia de color verde cuando se ilumina con luz UV (Perdisky y Baillie 1977). La fluoresceína es un compuesto polar y, por tanto, no puede atravesar la membrana plasmática por transporte difusivo, acumulándose en el interior de la célula. En consecuencia, la fluorescencia celular es un reflejo de la viabilidad celular, evaluada por la integridad de la membrana plasmática y la actividad metabólica requerida para la hidrólisis de la FDA.

### III.1.2. Protocolos de crioconservación basados en la vitrificación

De acuerdo con Engelmann (2004), se pueden distinguir siete tipos de procedimientos de crioconservación basados en la vitrificación:

#### ▪ Encapsulación-deshidratación

El procedimiento de encapsulación-deshidratación está basado en la tecnología desarrollada para la producción de semillas artificiales. Este protocolo consiste en la encapsulación de los explantos en cuentas de alginato, su desecación bajo el flujo de aire de una cabina de flujo laminar o mediante incubación con silica gel, y su posterior descongelación de forma rápida (Dereuddre *et al.* 1991). La supervivencia es alta y la recuperación del crecimiento de las muestras crioconservadas es generalmente rápida y directa, sin formación de callo.

Esta técnica ha sido aplicada en ápices de numerosas especies de origen templado y tropical además de suspensiones celulares y ES de diversas especies (Gonzalez-Arno y Engelmann 2006; Engelmann *et al.* 2008).

#### ▪ Vitrificación

La vitrificación incluye los siguientes pasos: precultivo de los explantos en medio con sustancias crioprotectoras, tratamiento con una solución de carga, deshidratación con una solución vitrificante altamente concentrada, congelación y descongelación rápidas, retirada de los crioprotectores y recuperación.

Este procedimiento ha sido desarrollado para ápices, suspensiones celulares, tejidos embriogénicos y ES de numerosas especies (Sakai y Engelmann 2007; Sakai *et al.* 2008).

### ▪ Encapsulación-vitrificación

Es una combinación de los procedimientos de encapsulación-deshidratación y vitrificación. En este método, los explantos encapsulados en cuentas de alginato se incuban en LS y PVS y posteriormente se introducen rápidamente en NL. Debido a la presencia de la cápsula, el tiempo de incubación en las soluciones vitrificantes necesita ser prolongado (Kaviani *et al.* 2010). Esta técnica combina las ventajas de un procedimiento rápido, con la protección química y física y la fácil manipulación que proporciona la encapsulación de las muestras (Kulus y Zalewska 2014)

Esta técnica ha sido aplicada a ápices de un gran número de especies (Sakai y Engelmann 2007 y Sakai *et al.* 2008).

### ▪ Deshidratación

Es el método más simple ya que consiste en la deshidratación de los explantos y su posterior congelación rápida por inmersión directa en NL. La desecación se lleva a cabo normalmente bajo el flujo de aire de una cabina de flujo laminar, pero se consiguen condiciones de deshidratación más precisas y reproducibles mediante la utilización de aire estéril comprimido o silica gel. La desecación ultrarrápida en una corriente de aire comprimido seco, procedimiento denominado '*flash drying*', permite la congelación de muestras con un contenido hídrico relativamente alto (Berjak *et al.* 1989).

Esta técnica ha sido aplicada a embriones de un gran número de especies recalcitrantes e intermedias (Engelmann 1997).

### ▪ Precultivo

Esta técnica consiste en el cultivo de las muestras en presencia de crioprotectores, seguido de la congelación rápida de las mismas mediante inmersión directa en NL (Panis *et al.* 2002). El precultivo es una etapa importante en la crioconservación (Kulus y Zalewska 2014) ya que estimula la acumulación de azúcares, polipéptidos, ABA y prolina, lo que incrementa la tolerancia al estrés hídrico y la congelación (Suzuki *et al.* 2006).

### ▪ Precultivo–deshidratación

En este procedimiento, los explantos son precultivados en presencia de crioprotectores, deshidratados bajo el aire de una cabina de flujo laminar o con silica gel y congelados rápidamente.

Este método ha sido aplicado a segmentos de tallo de espárrago, ES de palma de aceite y EZ de coco (Uragami *et al.* 1990; Assy-Bah y Engelmann 1992; Dumet *et al.* 1993).

### ▪ Vitrificación en gota

La combinación del tratamiento con soluciones vitrificantes con el método de congelación en gota, desarrollado para ápices de mandioca (Kartha *et al.* 1982), ha dado lugar a una técnica nueva y eficiente denominada vitrificación en gota (Gonzalez-Arno *et al.* 2008). En este procedimiento, los explantos, previamente incubados en LS y PVS, se sitúan en pequeñas gotas de solución vitrificante sobre una tira de aluminio antes de su inmersión directa en NL.

La principal ventaja de esta técnica es la posibilidad de conseguir altas velocidades de

congelación y descongelación debido al pequeño volumen de solución crioprotectora en el que se colocan los explantos (Sakai y Engelmann 2007). Además, la alta conductividad térmica del aluminio aumenta significativamente la velocidad de ambos procesos. Las altas velocidades de enfriamiento y descongelación que se consiguen con este procedimiento aumentan de forma significativa la probabilidad de obtener un estado vitrificado durante el enfriamiento y evitar la desvitrificación durante la descongelación (Panis *et al.* 2005).

Este procedimiento ha sido aplicado a un número limitado de especies vegetales (Sakai y Engelmann 2007) pero los resultados obtenidos son prometedores y anticipan una amplia aplicación del mismo (Vujović *et al.* 2011).

### III.1.3. Crioconservación de cultivos embriogénicos de olivo

Los cultivos embriogénicos de olivo pueden ser muy heterogéneos. Mientras que algunos proliferan como callos, otros están compuestos principalmente por ES en diferentes estados de desarrollo (Sánchez-Romero *et al.* 2009). Aunque los cultivos embriogénicos son en general considerados tejidos adecuados para la crioconservación, los ES y el callo embriogénico son estructuralmente muy diferentes. Mientras que el callo embriogénico usualmente consiste en una población relativamente homogénea de células pequeñas, poco vacuoladas y en división activa, los ES son estructuras complejas con una composición celular heterogénea (Gonzalez-Arnan *et al.* 2008) en la que predominan las células grandes, diferenciadas y altamente vacuoladas. La composición celular determina significativamente la respuesta de los explantos a la crioconservación debido a su diferente tolerancia a los procesos de desecación y congelación (Van den Houwe y Panis 2000). En general, las características celulares del callo embriogénico lo hacen más adecuado para superar la crioconservación que los ES.

Aunque inicialmente en olivo los experimentos de transformación genética se llevaron a cabo utilizando indistintamente callo embriogénico y ES (Lambardi *et al.* 1999; Pérez-Barranco *et al.* 2007; Pérez-Barranco *et al.* 2009), en los últimos años, los ES se han convertido en el explanto mayoritariamente usado en este tipo de estudios (Torreblanca *et al.* 2010; Jafarzadeh-Bajestani *et al.* 2011).

En olivo, el callo embriogénico ha sido crioconservado con éxito utilizando el método de vitrificación en gota desarrollado por Panis *et al.* (2005) (Sánchez-Romero *et al.* 2009). Siguiendo este método, el 100% de los explantos recuperó la proliferación embriogénica seis semanas después de la congelación. Sin embargo, los ES de esta especie han sido conservados en NL con resultados variables. Shibli y Al-Juboory (2000) crioconservaron ES en estado cotiledonar utilizando procedimientos de encapsulación-deshidratación y encapsulación-vitrificación. Las tasas de recrecimiento oscilaron entre el 40 y el 54%, dependiendo del método utilizado para deshidratar los explantos. Lambardi *et al.* (2001) crioconservaron una mezcla de ES en diferentes estadios de desarrollo, embriones anormales y estructuras teratómicas usando técnicas tanto clásicas como modernas. Los mejores resultados se obtuvieron cuando los explantos fueron incubados en PVS2 durante 90 min. En estas condiciones, el 38% de las muestras mostraron recrecimiento después de la descongelación y retomaron la actividad proliferativa. Lynch *et al.* (2011) crioconservaron agregados de ES mediante congelación lenta, consiguiendo la recuperación del desarrollo embriogénico y una tasa de recrecimiento del 34,6%, evaluada como la ganancia de peso fresco, cuando los explantos fueron pretratados durante 3 días con sacarosa 0,75 M.

Aunque los métodos de congelación lenta han sido aplicados satisfactoriamente a la crioconservación de cultivos embriogénicos de diferentes especies (Lambardi *et al.* 2008), estructuras complejas como los ES no pueden ser congelados de forma efectiva utilizando

estas técnicas, por lo que se recomienda la aplicación de métodos basados en la vitrificación (Gonzalez-Arnan *et al.* 2008). Las altas velocidades de congelación y descongelación que se consiguen en el método de vitrificación en gota lo hacen especialmente adecuado para la congelación de estructuras complejas.

## III.2. Material y métodos

### III.2.1. Material vegetal

Se utilizaron cultivos embriogénicos de olivo (*Olea europaea* L.) inducidos y mantenidos tal y como se describe en los apartados II.2.4. y II.2.5.

### III.2.2. Protocolo de crioconservación

La crioconservación de ES de olivo se llevó a cabo utilizando el método de vitrificación en gota sobre tiras de aluminio desarrollado por Panis *et al.* (2005) para ápices de banana y que en trabajos previos con callo embriogénico de olivo había dado lugar a mejores resultados que el método clásico de vitrificación (Sakai *et al.* 1990) o el de congelación lenta (Panis *et al.* 1990) (Sánchez-Romero *et al.* 2009).

ES procedentes de medio de mantenimiento se transfirieron a tubos de poliestireno de 30 ml con aproximadamente 10 ml de solución LS esterilizada por filtración, consistente en glicerol 2 M y sacarosa 0,4 M disueltos en medio basal ECO (ECO<sup>-</sup>) (pH 5,74). Después de 20 min en oscuridad a temperatura ambiente, la solución LS fue reemplazada por aproximadamente 10 ml de solución PVS2 a 0°C, compuesta por glicerol 3,26 M, etilenglicol 2,42 M y DMSO 1,9 M disueltos en medio ECO<sup>-</sup> con sacarosa 0,4 M (pH 5,74). Una vez concluido el tiempo de incubación en PVS2, los explantos, rodeados por una gota de PVS2, fueron transferidos a una tira de aluminio de aproximadamente 6 x 35 mm. Para que la temperatura de la tira de aluminio se mantuviera en torno a 0°C, todas las manipulaciones se realizaron sobre una placa refrigerante congelada. Después del tratamiento con PVS2, las tiras de aluminio fueron sumergidas rápidamente en NL, donde permanecieron al menos 30 min. Para la descongelación, las tiras se sacaron del NL y rápidamente se sumergieron en placas de Petri con solución de recuperación, consistente en medio ECO<sup>-</sup> con 1,2 M sacarosa (pH 5,74). Los explantos permanecieron en esta solución a temperatura ambiente durante 15 min antes de ser colocados sobre discos de papel filtro estéril dispuestos sobre medio ECO con 0,3 M sacarosa y ácido ascórbico al 0,001% (p/v). Veinticuatro horas después, los cultivos fueron transferidos a medio estándar de proliferación.

Salvo que se indique lo contrario, los explantos utilizados para los experimentos de crioconservación consistieron en 100 mg de ES de 1-6 mm de longitud seleccionados de cultivos en medio de mantenimiento 6-7 semanas después del último subcultivo. En todos los casos las muestras se deshidrataron en PVS2 durante 30 min.

### III.2.3. Efecto del tiempo en PVS2

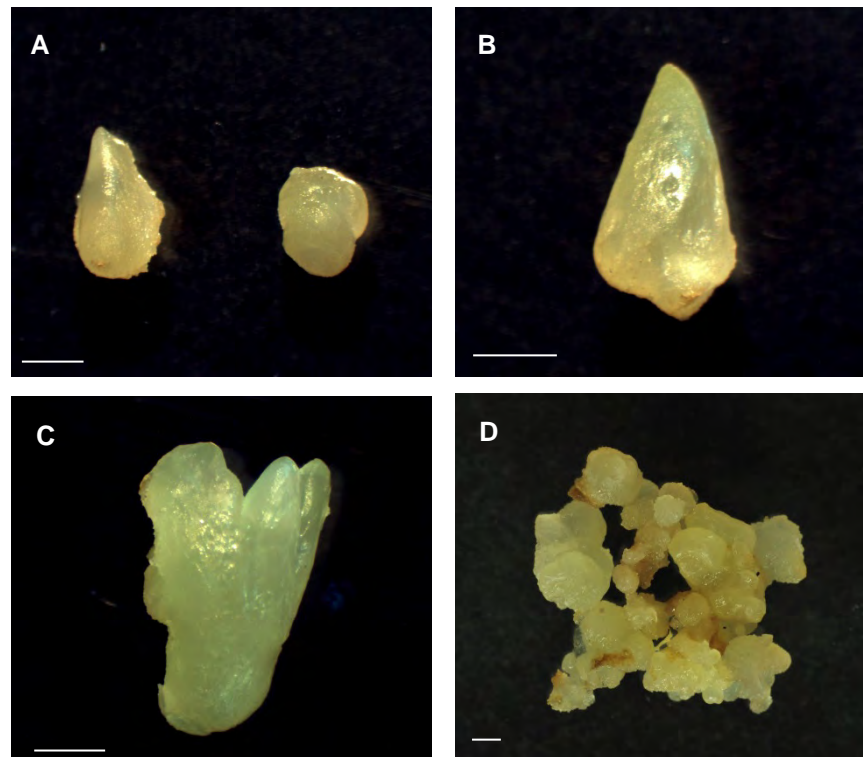
En este experimento se estudió el efecto del tiempo de incubación en PVS2 sobre la crioconservación de ES de olivo. Para ello, ES de 1-6 mm de longitud se incubaron en PVS2 a 0°C durante 0, 30, 60, 90 y 120 min antes de ser sumergidos en NL.

Para evaluar el efecto de las soluciones crioprotectoras y del proceso de congelación, se incluyeron dos tipos de controles: control tratado, consistente en muestras tratadas con las soluciones crioprotectoras pero no congeladas, y control no tratado, consistente en muestras no tratadas y no congeladas.



### III.2.4. Efecto del tipo de explanto utilizado en la crioconservación

Para estudiar la influencia del tipo de material utilizado como explanto en la crioconservación, se probaron distintos tipos de tejido embriónico. Así, 6-7 semanas después del último subcultivo, a partir de cultivos embriónicos en medio de mantenimiento se seleccionaron las siguientes estructuras: ES de 1-2 mm de longitud, ES de 3-4 mm de longitud, ES de 5-6 mm de longitud, una mezcla de ES de diferente tamaño (1-6 mm) y el material normalmente utilizado para el mantenimiento de los cultivos embriónicos de olivo (MP), consistente en una mezcla de callo embriónico y ES en estado globular (Fig. 23). En cada caso se incluyeron los correspondientes controles tratados y no tratados.



**Figura 23.** Explantos embriónicos testados: A) ES de 1-2 mm de longitud, B) ES de 3-4 mm de longitud, C) ES de 5-6 mm de longitud, D) MP. Barra = 1 mm.

### III.2.5. Efecto del método de cultivo y de la fase de crecimiento de los cultivos

Para estudiar el efecto del método de cultivo y de la fase de crecimiento de los cultivos, se cultivaron ES de olivo en medio ECO líquido y sólido y se muestrearon en diferentes momentos, correspondientes a distintas fases de crecimiento del cultivo.

Para el inicio de cultivos en medio líquido, 400 mg de ES de 1-6 mm de longitud fueron transferidos a matraces Erlenmeyer de 100 ml con 40 ml de medio ECO sin agente gelificante. Las suspensiones embriónicas se mantuvieron en oscuridad, con agitación orbital a 100 rpm. Los cultivos en medio sólido se iniciaron cultivando 200 mg de ES en tubos de 25 x 150 mm que contenían 25 ml de medio ECO.

Las curvas de crecimiento de los ES en medio líquido y sólido se elaboraron determinando el incremento de peso relativo a lo largo de un ciclo de cultivo de 42 días. Al menos se analizaron 3 réplicas por tratamiento.

Tanto en medio líquido como en medio sólido, el efecto de la fase de crecimiento sobre la crioconservación se determinó a los 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días desde el inicio del cultivo. En cada uno de estos tiempos, los explantos utilizados para la crioconservación se recolectaron de al menos 3 cultivos elegidos al azar.

Para cada uno de los tratamientos se incluyeron los dos tipos de controles: tratado y no tratado.

### **III.2.6. Efecto de la crioconservación sobre el proceso de embriogénesis somática**

Con el objetivo de estudiar la influencia de la crioconservación sobre la obtención final de plantas, se evaluó el efecto de este proceso sobre cada una de las fases en las que se divide la embriogénesis somática en esta especie: mantenimiento, producción de ES y germinación. El estudio se llevó a cabo en tres líneas embriogénicas de edades diferentes: T1, T2 y P5.

Para ello, ES de 1-6 mm de longitud se deshidrataron en PVS2 durante 30 min y posteriormente se crioconservaron utilizando el método de vitrificación en gota sobre tiras de aluminio (Panis *et al.* 2005). A partir del material crioconservado se establecieron cultivos embriogénicos que se mantuvieron en condiciones estándar. 4,5-6 meses después de la descongelación, se estudió el comportamiento de material procedente del stock estándar y del establecido a partir de ES crioconservados. La metodología utilizada para la regeneración de plantas fue la descrita en el capítulo II.

### **III.2.7. Aplicabilidad del método de crioconservación a distintas líneas embriogénicas**

La aplicabilidad del protocolo de vitrificación en gota se evaluó en ES de distintas líneas embriogénicas. Para ello, se seleccionaron ES de 1-6 mm de longitud a partir de cultivos embriogénicos de las líneas T1, T2, T3, T4, T5, P1, P2, P3, P4 y P5, se deshidrataron durante 30 min en PVS2 y se congelaron rápidamente en NL. En este experimento solo se incluyeron los correspondientes controles no tratados.

### **III.2.8. Efecto de un precultivo a corto plazo con distintas concentraciones de sacarosa en medio sólido y líquido**

Para mejorar el porcentaje de recuperación de los cultivos y la tasa de crecimiento después de la crioconservación, se testó el efecto de un pretratamiento con distintas concentraciones de sacarosa durante diferentes periodos de tiempo. Dada la influencia que el método de cultivo había mostrado en experiencias anteriores, el experimento se llevó a cabo en ambos, medio líquido y medio sólido.

Así, antes de la crioconservación se cultivaron ES de 1-6 mm de longitud en medio ECO sólido o líquido suplementado con 0,2 M ó 0,4 M de sacarosa. En cada caso, el pretratamiento se llevó a cabo durante 1, 3 y 7 días. Como control se crioconservaron ES de 1-6 mm procedentes directamente del stock, 7 semanas después del último subcultivo. En cada uno de los tratamientos se incluyeron los correspondientes controles tratados y no tratados.

### **III.2.9. Efecto de un precultivo a largo plazo en medio sólido con distintas concentraciones de sacarosa**

Investigaciones previas llevadas a cabo con callo embriogénico de olivo pusieron de manifiesto el efecto positivo de un precultivo durante 7-8 semanas en medio de mantenimiento



suplementado con 0,4 M de sacarosa (Sánchez-Romero *et al.* 2009).

En el presente experimento se estudió el efecto de este tipo de precultivo sobre la crioconservación de ES de esta especie. Para ello, ES de 1-6 mm de longitud se cultivaron en medio ECO sólido suplementado con 0,2 ó 0,4 M sacarosa durante 42 días. A continuación, explantos procedentes de cada uno de los tratamientos anteriores así como ES tomados directamente del stock de cultivos embriogénicos fueron crioconservados siguiendo el protocolo de Panis *et al.* (2005). En cada tratamiento se incluyeron controles tratados y no tratados.

### **III.2.10. Efecto de un precultivo a largo plazo en medio líquido con distintas concentraciones de sacarosa**

Dada la influencia del método de cultivo sobre la posterior respuesta de los explantos a la crioconservación, el efecto de un precultivo a largo plazo con sacarosa también se evaluó en medio líquido.

ES seleccionados del stock de cultivos embriogénicos fueron transferidos a matraces Erlenmeyer de 100 ml con 40 ml de medio ECO líquido suplementado con 0,2 ó 0,4 M sacarosa. Las suspensiones embriogénicas se mantuvieron en agitación orbital a 100 rpm durante 28 días, tiempo que en experimentos previos se había mostrado como óptimo para cultivos en medio líquido.

La respuesta a la crioconservación de explantos procedentes de cada uno de los tratamientos anteriores se comparó con la de explantos control, seleccionados directamente del stock de cultivos embriogénicos, 6-7 semanas después del último subcultivo. Para diferenciar el efecto de la congelación del debido a la incubación con soluciones crioprotectoras, en cada caso se incluyeron los correspondientes controles tratados y no tratados.

### **III.2.11. Influencia de la crioconservación y de un pretratamiento con sacarosa sobre la embriogénesis somática**

En el presente experimento se estudió el efecto sobre el proceso de embriogénesis somática de la crioconservación después de un precultivo durante 7 días en medio sólido con 0,2 M sacarosa, tratamiento en el que se habían obtenido los mejores resultados. Para esto, se utilizó material de la línea P5 procedente directamente del stock, material precultivado con sacarosa y posteriormente crioconservado y material crioconservado sin tratamiento previo. El experimento se llevó a cabo 4,5 meses después de la congelación.

La evaluación del efecto sobre cada una de las fases de la embriogénesis somática se llevó a cabo tal y como se detalla en el capítulo II. Los tallos obtenidos fueron multiplicados, enraizados y aclimatados siguiendo también la metodología indicada en ese capítulo.

### **III.2.12. Efecto de un pretratamiento con sacarosa sobre la aplicabilidad del método de crioconservación a distintas líneas embriogénicas**

Ya que en algunas líneas embriogénicas la tasa de recuperación de los cultivos después de la congelación había sido baja, se evaluó si la inclusión de un tratamiento a corto plazo con sacarosa antes de la crioconservación mejoraba los resultados. Con este propósito se crioconservaron ES (1-6 mm) procedentes directamente del stock o después de un precultivo en medio ECO con 0,2 M sacarosa durante 7 días. En cada caso se incluyó el control

correspondiente consistente en embriones no tratados y no congelados.

### III.2.13. Toma de datos

En todos los experimentos de crioconservación se realizaron al menos 5 réplicas por tratamiento y los experimentos se repitieron dos veces.

El resultado del experimento se evaluó durante dos ciclos de cultivo de 6 semanas cada uno. Al final de cada ciclo se tomaron datos de incremento de peso fresco, supervivencia, recuperación del cultivo y aspecto. La supervivencia fue estimada como el porcentaje de explantos que mostraron algún signo de crecimiento. La recuperación de cultivo se evaluó como el porcentaje de explantos que mostraron crecimiento con características embriogénicas.

En los experimentos en los que se evaluó el efecto de la crioconservación sobre el proceso de embriogénesis somática se iniciaron 20 cultivos por tratamiento en las fases de proliferación y maduración. El número de ES puestos a germinar fue variable, dependiendo del resultado de la fase de maduración. En cada fase se tomaron los datos detallados en el capítulo II. Para evaluar el efecto sobre el proceso de embriogénesis somática considerado globalmente, también se determinó el potencial de regeneración.

El número de brotes multiplicados, enraizados y aclimatados fue variable dependiendo del resultado de fases previas. El rendimiento de cada una de estas etapas se realizó tal y como se indica en el capítulo II.

### III.2.14. Tinción con FDA

La tinción con FDA se llevó a cabo de acuerdo con Widholm (1972). Para ello, se preparó una solución de FDA en acetona al 1% (p/v) que se almacenó a -20°C y, justo antes de su utilización, se diluyó al 2% (v/v) con agua.

Se añadieron varias gotas de esta solución a cada muestra y, después de 4 min de incubación a temperatura ambiente, se observó la fluorescencia en un microscopio estereoscópico Multizoom AZ-100 (Nikon, Tokyo, Japan) equipado con un sistema de epifluorescencia con lámpara de mercurio de alta presión, filtro GFP-B (EX 460-500; DM 505; BA 510-560) y zoom Nikon AZ Plan APO 1X.

La tinción con FDA se llevó a cabo en ES de 1-6 mm de longitud recolectados directamente del stock y crioconservados después de un tratamiento con PVS2 durante 30 min. El análisis se llevó a cabo 0, 1, 2, 4, 7, 10, 15 y 20 días después de la descongelación.

Se ejecutaron análisis adicionales con FDA para evaluar la posible existencia de diferencias entre las diferentes estructuras embriogénicas testadas como explantos para la crioconservación. Con este propósito, MP y ES de distinto tamaño (1-2, 3-4 y 5-6 mm) se tiñeron separadamente con FDA antes de cualquier tratamiento de crioconservación.

En cada tratamiento se tiñeron al menos 3 muestras independientes, representativas del patrón de proliferación observado en cada caso.

### III.2.15. Análisis estadístico

Los datos de porcentajes se analizaron mediante análisis de frecuencias utilizando el test de independencia RxC o un análisis log lineal de tres vías para evaluar interacciones entre variables. Para el resto de datos se realizaron ANOVA, estableciendo las diferencias entre

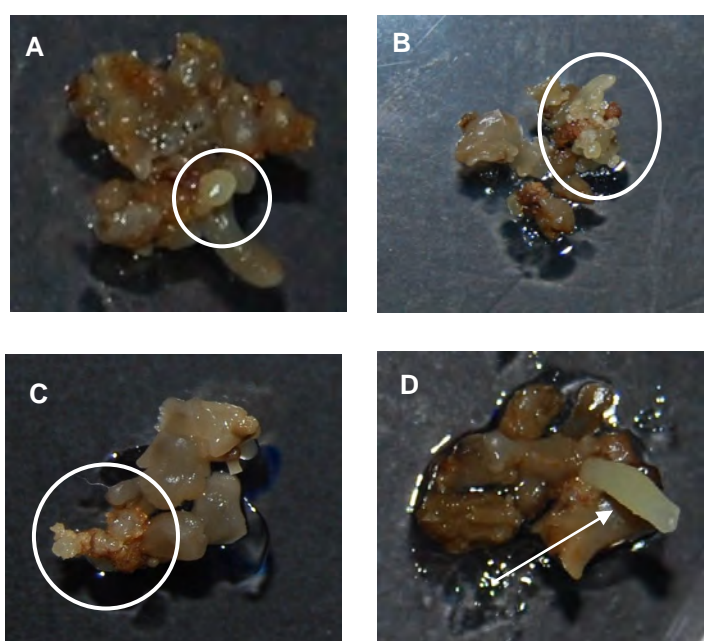
medias a través del test DMS (Sokal y Rohlf 2003). El nivel de significación fue del 5% en todos los casos.

### III.3. Resultados

#### III.3.1. Efecto del tiempo en PVS2

Después de la descongelación, las muestras crioconservadas se volvieron marrones, adquiriendo posteriormente una coloración más oscura y/o grisácea. Los datos de supervivencia y de recuperación del cultivo coincidieron en todos los casos ya que las muestras que sobrevivieron siempre presentaron crecimiento con características embriogénicas.

Los primeros signos de supervivencia aparecieron 20-30 días después de la descongelación. El nuevo crecimiento consistió normalmente en el desarrollo de ES en estado globular, que podían aparecer aislados (Fig. 24A) o en grupo (Fig. 24B). En algunas ocasiones también se observó la formación de callo embriogénico (Fig. 24C) y, muy escasamente, el aumento de tamaño de embriones congelados (Fig. 24D).

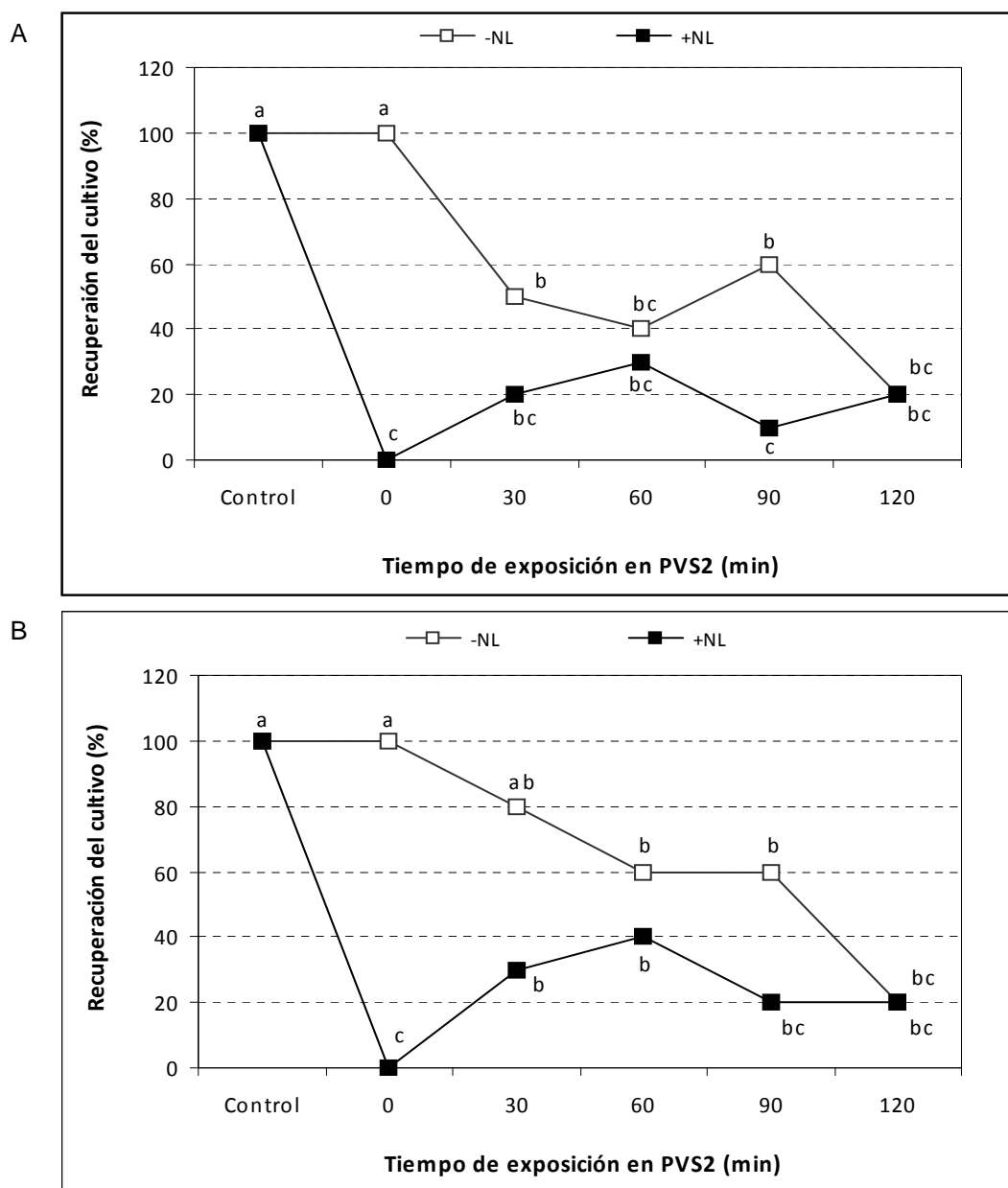


**Figura 24.** Patrones de crecimiento observados en ES de olivo crioconservados. A) Formación de ES aislados, B) o en grupo, C) proliferación de callo embriogénico y D) aumento del tamaño del embrión congelado.

La incubación con soluciones crioprotectoras afectó de forma negativa a los cultivos aunque el efecto de la solución LS fue menor que el de la solución PVS2. Aunque la incubación durante 20 min en LS (-NL 0) provocó una disminución importante del incremento de peso (datos no mostrados), no afectó a la tasa de supervivencia o de recuperación de los cultivos (Fig. 25). La deshidratación con PVS2 (-NL), sin embargo, afectó de forma significativa ( $P = 0,0010$ ) a la supervivencia de los explantos, observándose 12 semanas después del tratamiento, una correlación negativa entre el tiempo de incubación en esta solución y el porcentaje de cultivos recuperados (Fig. 25). La proliferación de los ES tratados con PVS2 fue escasa, significativamente ( $P = 0,0002$ ) menor que la registrada en los controles no tratados (datos no mostrados). No se observaron diferencias significativas entre los distintos tiempos de incubación en PVS2.

No obstante, los resultados obtenidos después de la congelación (+NL) pusieron de manifiesto la necesidad de un tratamiento de deshidratación con PVS2 ya que ningún explanto

no tratado con esta solución (+NL 0) sobrevivió a la congelación en NL (Fig. 25).



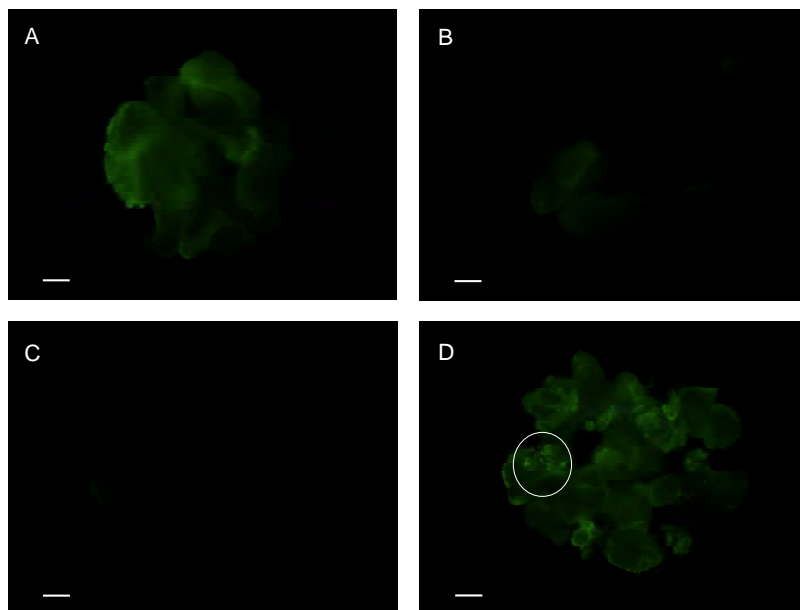
**Figura 25.** Recuperación del cultivo después de diferentes tiempos de incubación en PVS2, con (+NL) o sin (-NL) inmersión posterior en NL. Evaluación hecha A) seis y B) doce semanas después del tratamiento.

La congelación provocó daños adicionales. Seis semanas después de la inmersión en NL, la tasa de recuperación de los cultivos osciló entre el 10 y el 30%, dependiendo del tiempo de incubación en PVS2 (Fig. 25). Aunque seis semanas después los porcentajes de recuperación aumentaron en algunos de los tratamientos, los valores obtenidos continuaron siendo bajos. No se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos con PVS2 (30-120 min), aunque valores ligeramente más elevados se registraron después de 30 y 60 min en esta solución.

Considerando los datos anteriores y la alta sensibilidad que los ES de olivo mostraron en trabajos previos a las soluciones crioprotectoras (Sánchez-Romero *et al.* 2009), se estableció

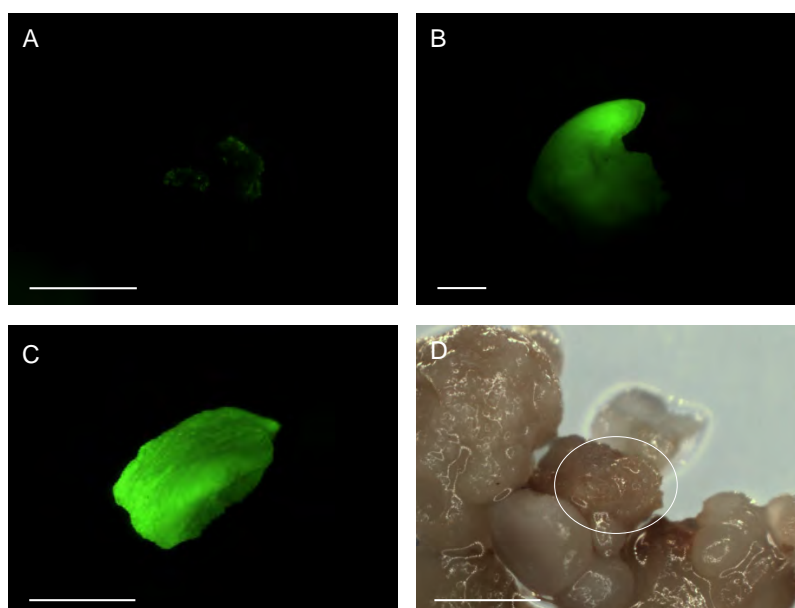
30 min como el tiempo de incubación adecuado para la crioconservación de este tipo de explanto.

La tinción con FDA de explantos crioconservados después de 30 min de deshidratación en PVS2 reveló importantes diferencias conforme avanzó el tiempo después de la descongelación. Justo después de la descongelación (día 0), todos los explantos aparecieron homogéneamente teñidos, aunque la fluorescencia fue débil (Fig. 26A). Esta tinción tenue y generalizada desapareció gradualmente conforme fue pasando el tiempo. Dos días después de la descongelación pudo observarse un descenso significativo tanto de la intensidad como de la distribución de la tinción y solo pocas partes de los explantos continuaron siendo ligeramente fluorescentes (Fig. 26B). Dos días después, este tipo de fluorescencia fue prácticamente inapreciable (Fig. 26C). Dos días después, este tipo de fluorescencia fue prácticamente inapreciable (Fig. 26C).



**Figura 26.** Tinción con FDA de ES de olivo crioconservados siguiendo el método de vitrificación en gota después de un tratamiento con PVS2 durante 30 min. Análisis llevado a cabo A) justo después de la descongelación (día 0), B) dos días después de la descongelación, C) cuatro días después de la descongelación y D) un día después de la descongelación. Barras = 1 mm.

Un patrón de tinción distinto, consistente en un número limitado de células altamente fluorescentes, pudo observarse en paralelo. Cuando la tinción tenue y generalizada todavía era apreciable, estas células podían ser claramente distinguidas del resto de tejido ligeramente teñido (Fig. 26D). Este tipo de fluorescencia se observó por primera vez un día después de la descongelación y su frecuencia aumentó normalmente con el tiempo. Esta tinción intensa y específica pudo observarse en unas pocas células (Fig. 27A) o en regiones relativamente extensas, como ápices de embriones (Fig. 27B) o embriones completos (Fig. 27C). Observaciones en campo claro pusieron de manifiesto que la tinción limitada a unas pocas células normalmente se correspondía con áreas en proliferación activa (Fig. 27D).



**Figura 27.** Tinción con FDA de ES crioconservados 10-20 días después de la descongelación: A) Células en proliferación, B) ápice de un embrión y C) embrión completo. D) Campo claro de la zona fluorescente observada en la figura A. Barra = 1 mm.

### III.3.2. Efecto del tipo de explanto utilizado en la crioconservación

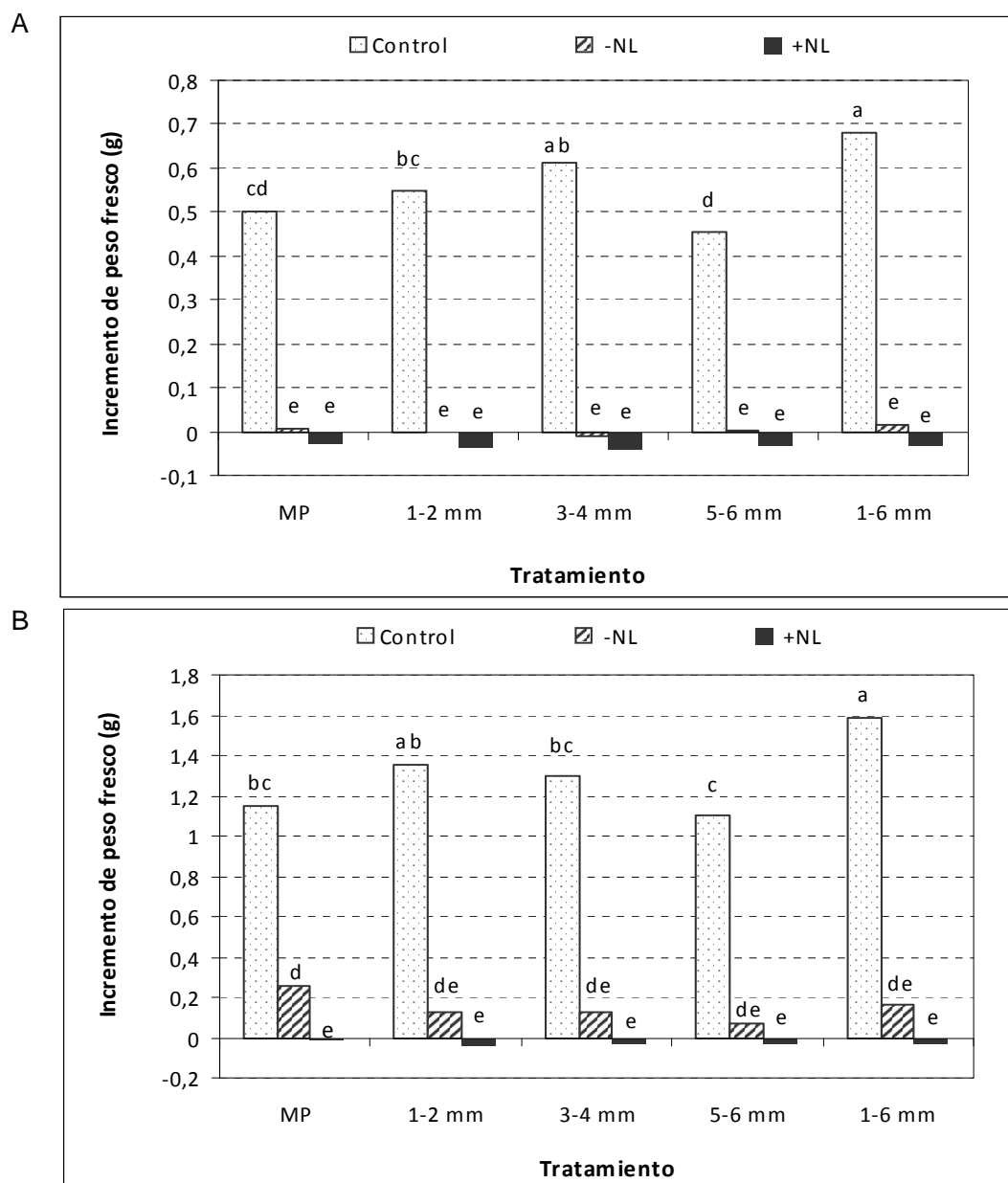
Los distintos tipos de explanto (controles no tratados), mostraron un crecimiento diferente en medio de proliferación (Fig. 28). Los valores de incremento de peso más elevados se obtuvieron con una mezcla de ES en diferentes estadios de desarrollo (ES 1-6 mm) mientras que los más bajos se registraron en los ES de mayor tamaño (ES 5-6 mm).

Los explantos testados mostraron una alta sensibilidad a las soluciones crioprotectoras presentando en todos los casos valores de incremento de peso significativamente ( $P = 0,0000$ ) más bajos que los controles no tratados (Fig. 28). No obstante, doce semanas después del tratamiento, las tasas de supervivencia y de recuperación del cultivo solo se vieron afectadas de forma significativa ( $P = 4,128 \cdot 10^{-5}$ ) en ES 5-6 mm (Fig. 29).

Las soluciones crioprotectoras no protegieron adecuadamente a los distintos tipos de explanto, observándose en todos los casos un descenso significativo ( $P = 0,0000$ ) de la tasa de recuperación después de la congelación (Fig. 29). El crecimiento, sin embargo, solo se vio afectado por la congelación en MP.

Los valores de recuperación del cultivo obtenidos después de la crioconservación fueron en general muy bajos. No obstante, se consiguieron porcentajes ligeramente más elevados cuando se utilizaron los explantos más heterogéneos consistentes en una mezcla de calo embriogénico y ES en estadios tempranos de desarrollo (MP) o una mezcla de ES de distinto tamaño (1-6 mm).

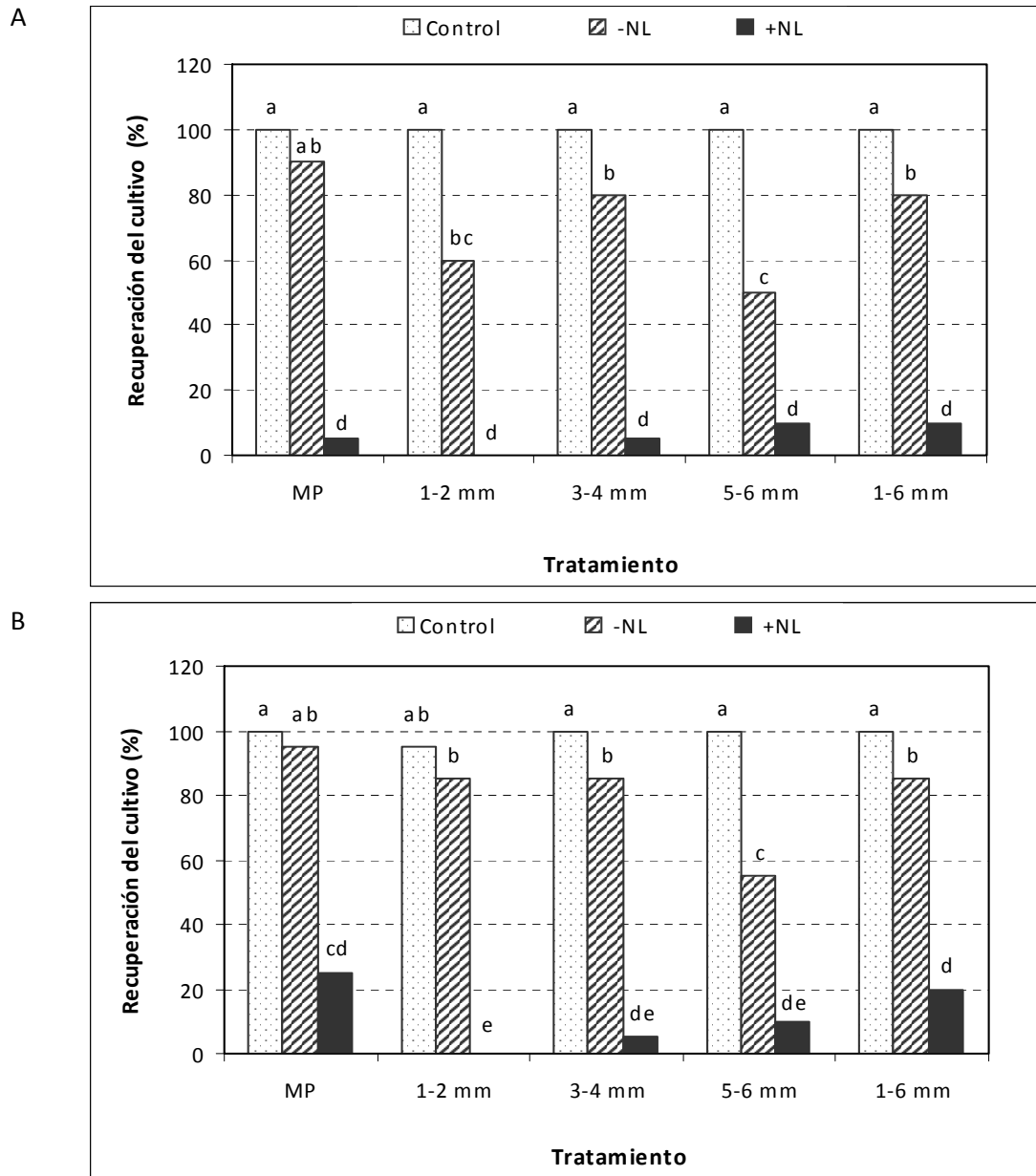
Las primeras muestras de crecimiento se observaron 19-25 días después de la descongelación, sin diferencias importantes entre los distintos tipos de explantos.



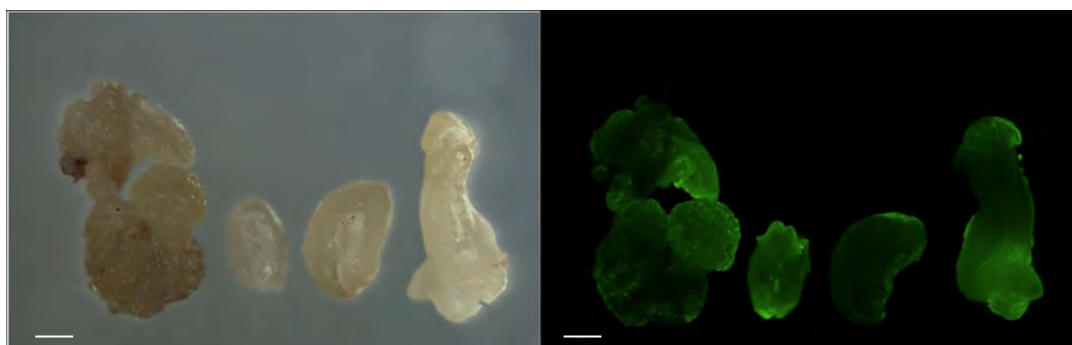
**Figura 28.** Incremento de peso fresco de diferentes tipos de explantos embriogénicos de olivo no tratados (control), tratados con soluciones crioprotectoras pero no congelados (-NL) y crioconservados (+NL). Datos tomados A) 6 y B) 12 semanas después del tratamiento.

Respecto a la tinción con FDA, no se encontraron diferencias entre los distintos explantos testados para la crioconservación, apareciendo todos intensa y uniformemente teñidos (Fig. 30). No obstante, ocasionalmente pudo observarse una fluorescencia algo más intensa coincidiendo con áreas altamente proliferativas, tales como el callo embriogénico presente en el explanto MP o regiones en las que los ES mostraban embriogénesis secundaria.





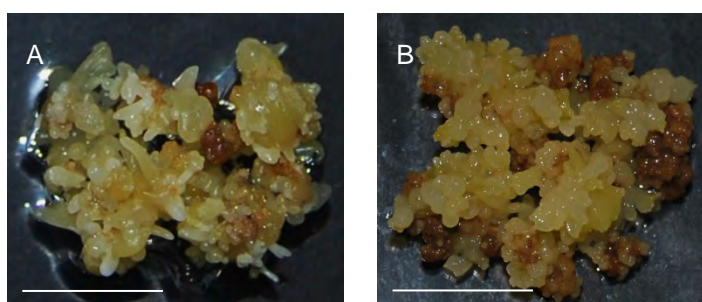
**Figura 29.** Recuperación del cultivo en diferentes tipos de explantos embriogénicos de olivo no tratados (control), tratados con soluciones crioprotectoras pero no congelados (-NL) y crioconservados (+NL). Datos tomados A) 6 y B) 12 semanas después del tratamiento



**Figura 30.** Distintos tipos de explantos embriogénicos observados A) en campo claro y B) después de ser teñidos con FDA: MP, ES 1-2 mm, ES 3-4 mm y ES 5-6 mm. Barra = 1 mm.

### III.3.3. Efecto del método de cultivo y de la fase de crecimiento de los cultivos

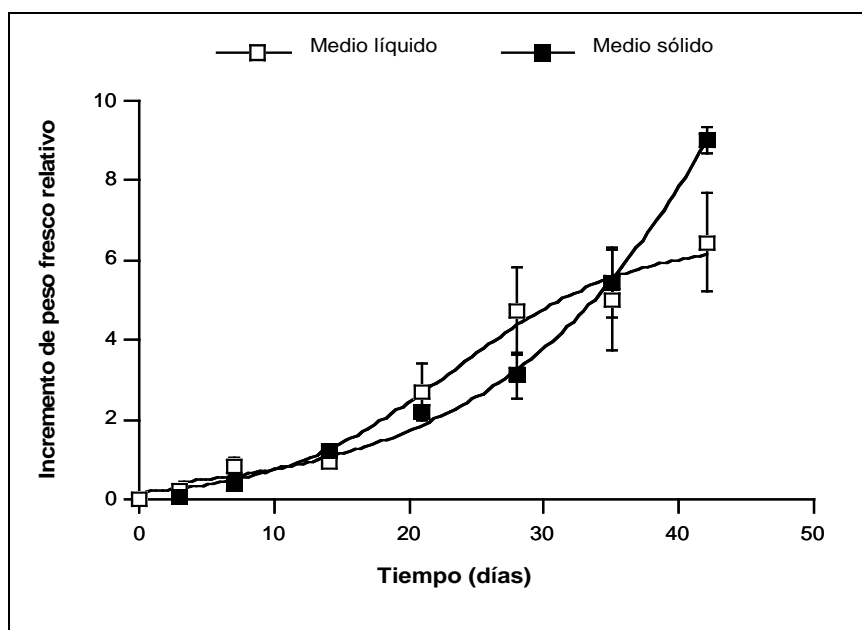
El aspecto de los cultivos varió a lo largo del subcultivo, dependiendo del método de cultivo, en medio sólido o líquido (Fig. 31).



**Figura 31.** Aspecto general de un cultivo en medio A) sólido y B) líquido. Barra = 10 mm.

En las curvas de crecimiento también se observaron diferencias importantes dependiendo del método de cultivo (Fig. 32). Aunque los datos de incremento de peso fresco relativo podían ajustarse en ambos casos a una curva sigmoideal, se obtuvieron funciones diferentes en medio sólido ( $y = 0,18/0,0277 + e^{(-0,154x)}$ ) ( $R^2 = 0,995$ ) y líquido ( $y = 0,18/(0,0277 + e^{(-0,154x)})$ ) ( $R^2 = 0,982$ ). La dinámica de crecimiento fue claramente distinta, llegándose a cada una de las fases en momentos diferentes (Tabla 6). Además, a diferencia de los cultivos en medio líquido, después de 42 días los cultivos en medio sólido no alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento.

Las tasas de crecimiento más elevadas se consiguieron en medio sólido después de 35 días de cultivo (Fig. 32), con un incremento de peso fresco relativo de  $0,50 \text{ día}^{-1}$  frente a  $0,24 \text{ día}^{-1}$  conseguido en medio líquido en el periodo entre 21 y 28 días.



**Figura 32.** Incremento de peso fresco relativo de ES cultivados durante 42 días en medio sólido o líquido. Los datos representados muestran la media  $\pm$  error estándar de al menos tres cultivos independientes.

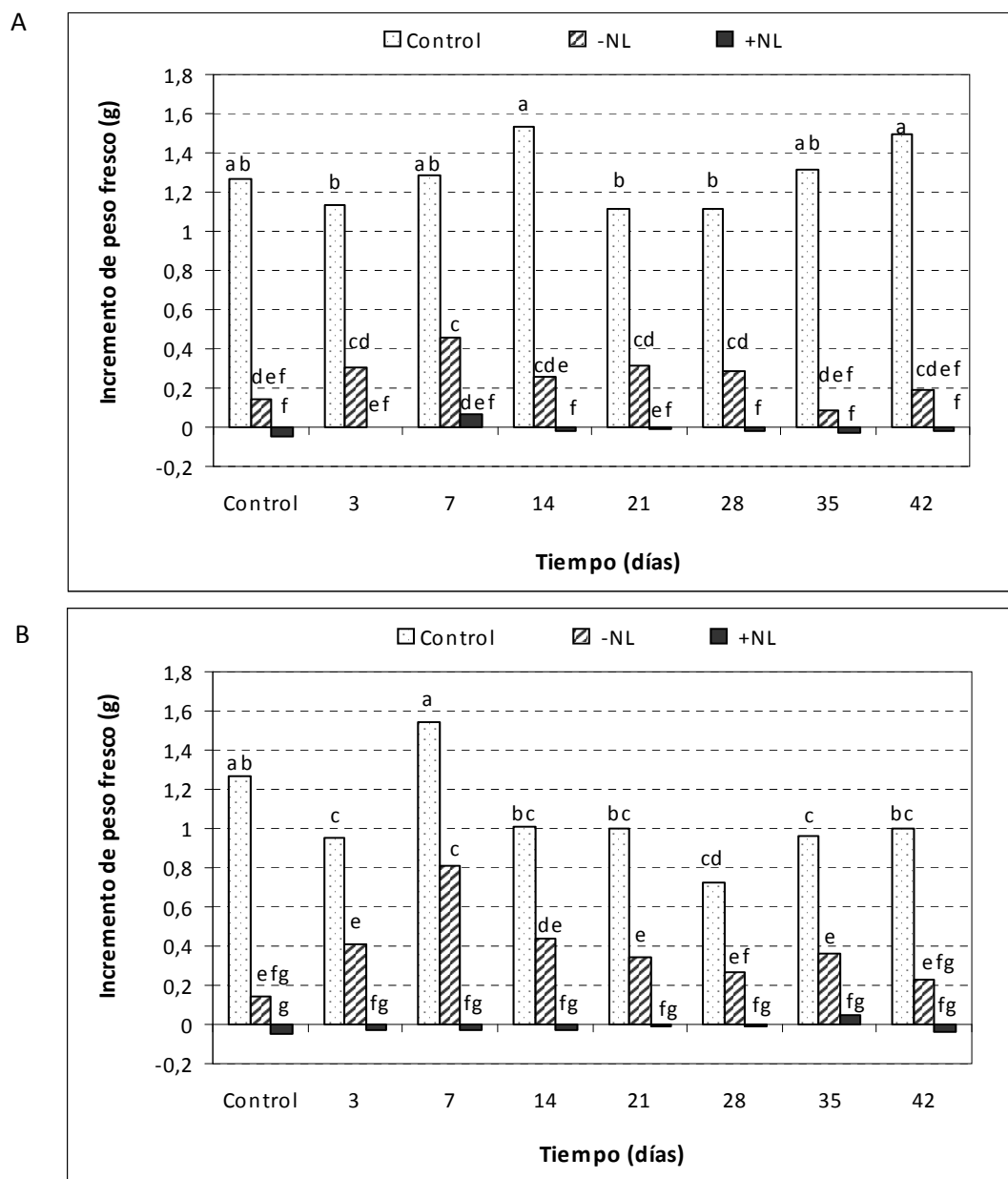
**Tabla 6.** Fases de crecimiento de ES en medio de proliferación sólido o líquido.

Fases de crecimiento	Tiempo en medio líquido (días)	Tiempo en medio sólido (días)
Lag	0-10	0-14
Exponencial temprana	11-16	15-33
Exponencial	17-28	34-42
Estacionaria	29-42	-

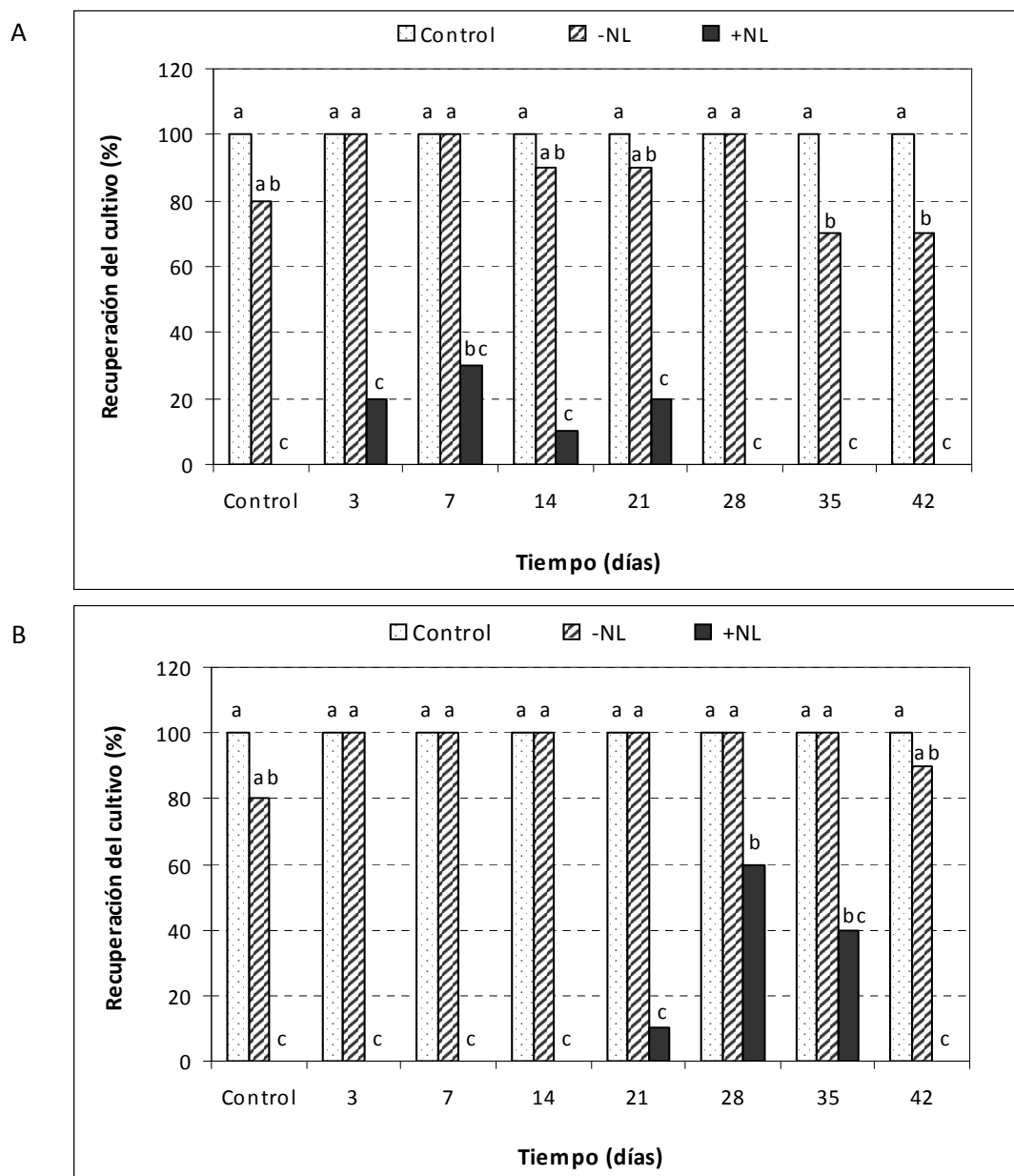
Doce semanas después de la transferencia de los explantos a medio de proliferación, la tasa de crecimiento de los controles no tratados se vio afectada de forma significativa por el medio de procedencia ( $P = 0,0019$ ), sólido o líquido, y por la fase de crecimiento ( $P = 0,0195$ ) en la que habían sido recolectados (Fig. 33). Así, los valores de incremento de peso oscilaron entre 1,11 y 1,54 g en medio sólido y entre 0,72 y 1,55 g en medio líquido. En los dos casos, los mejores resultados se obtuvieron con material en fase lag de crecimiento.

Tal y como revelaron los datos de incremento de peso, el efecto de las soluciones crioprotectoras fue diferente dependiendo del método de cultivo ( $P = 0,0209$ ) y de la fase de crecimiento ( $P = 0,0004$ ) (Fig. 33). En general, se vieron menos afectados los explantos procedentes de cultivos en medio líquido. En ambos casos, medio líquido y sólido, los embriones que mejor soportaron el tratamiento con las soluciones LS y PVS2 fueron los recolectados 7 días después del subcultivo, en fase lag de crecimiento. No obstante, salvo en los cultivos mantenidos en medio sólido durante 35 y 42 días, la incubación con soluciones crioprotectoras no afectó significativamente a la tasa de recuperación de los cultivos (Fig. 34).

Doce semanas después de la congelación, la recuperación de los cultivos se vio influenciada de forma significativa por el método de cultivo ( $P = 0,0007$ ), el tiempo de cultivo ( $P = 0,0001$ ) y la interacción método de cultivo x tiempo de cultivo ( $P = 0,0004$ ) (Fig. 34). Mientras que en medio sólido los mejores resultados se obtuvieron 7 días después del subcultivo, con una recuperación del 30%, en medio líquido se registraron a los 28 días, con un 60%. No se observaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento de los cultivos crioconservados, que en todos los casos fue muy baja (Fig. 33).



**Figura 33.** Incremento de peso fresco en muestras no tratadas (control), tratadas con soluciones crioprotectoras pero no congeladas (-NL) y crioconservadas (+NL) recolectadas diferentes días después del subcultivo en medio A) sólido o B) líquido. Datos tomados 12 semanas después del tratamiento.

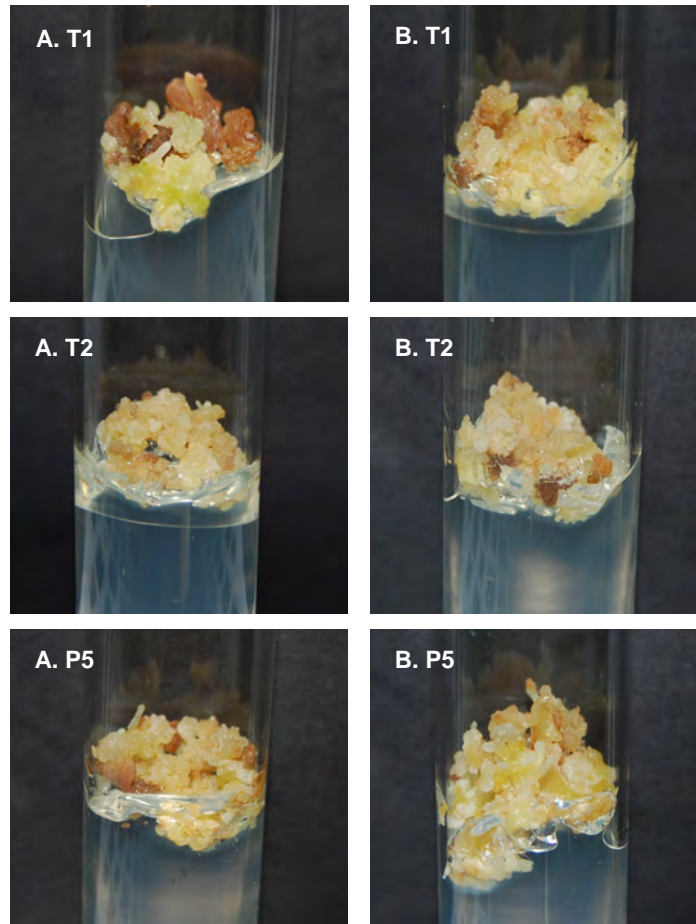


**Figura 34.** Recuperación del cultivo en muestras no tratadas (control), tratadas con soluciones crioprotectoras pero no congeladas (-NL) y crioconservadas (+NL) recolectadas diferentes días después del subcultivo en medio A) sólido o B) líquido. Datos tomados 12 semanas después del tratamiento.

### III.3.4. Efecto de la crioconservación sobre el proceso de embriogénesis somática

En este experimento se estudió el efecto de la crioconservación sobre cada una de las fases en las que se divide el proceso de embriogénesis somática en olivo: proliferación de cultivos embriogénicos, desarrollo de ES y germinación de los mismos.

Durante la fase de mantenimiento, el aspecto de los cultivos control y crioconservados fue similar dentro de cada línea (Fig. 35).

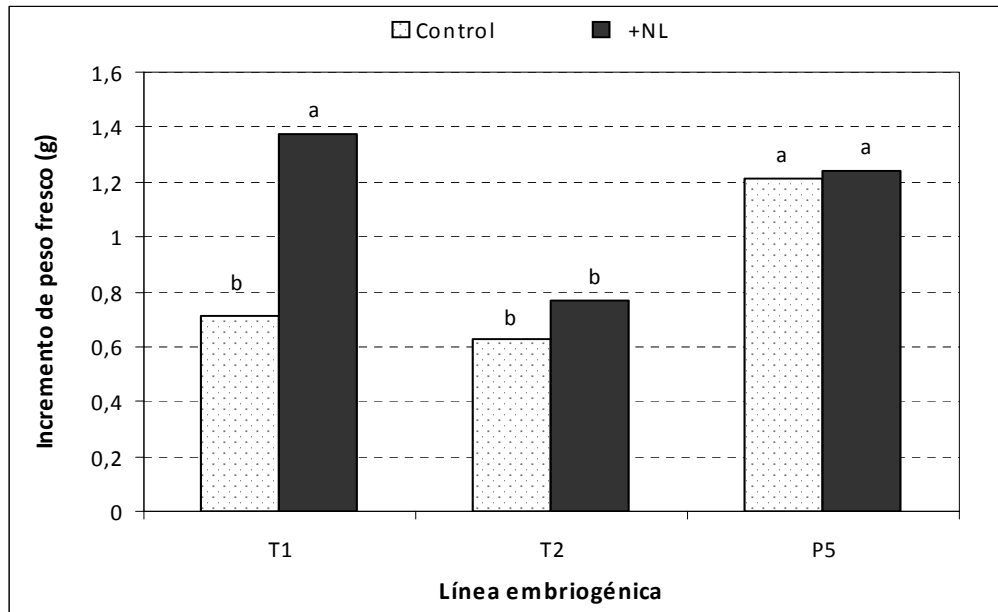


**Figura 35.** Aspecto de cultivos embriogénicos A) control y B) procedentes de ES crioconservados de las líneas T1, T2 y P5 al final de un ciclo de cultivo en medio de mantenimiento.

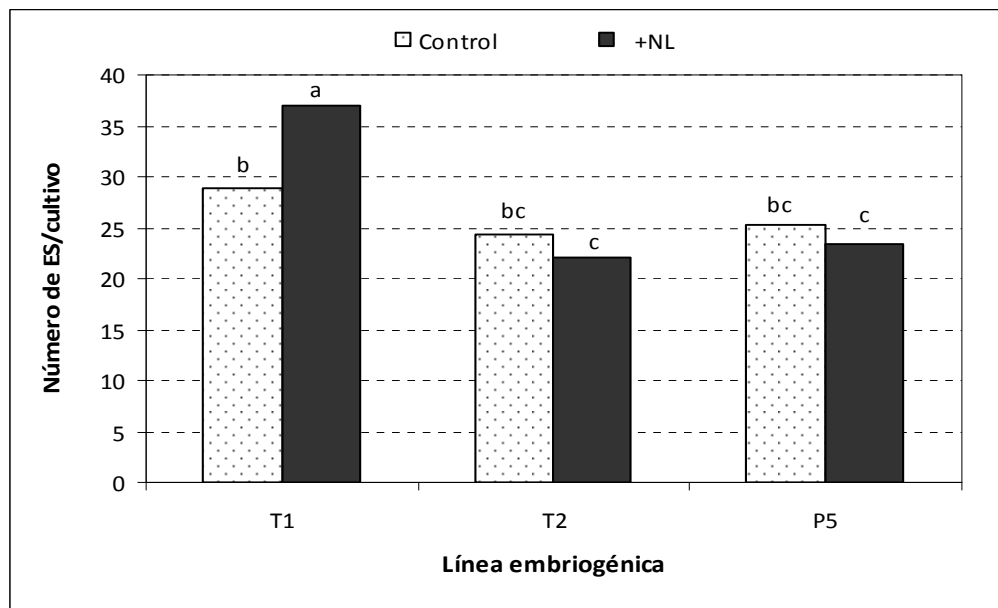
Los datos de incremento de peso en medio de mantenimiento pusieron de manifiesto un efecto significativo de la crioconservación ( $P = 0,0000$ ), el genotipo ( $P = 0,0000$ ) y la interacción entre ambos factores ( $P = 0,0000$ ) (Fig. 36). Así, mientras en la línea T1 se observó un aumento significativo de la proliferación de los cultivos debido a la congelación, en las líneas T2 y P5 no se observaron diferencias significativas.

Aunque la producción de ES durante la fase de mantenimiento no se vio afectada por la crioconservación, se observó un efecto significativo del genotipo ( $P = 0,0000$ ) y de la interacción genotipo x crioconservación ( $P = 0,0181$ ) (Fig. 37). Mientras que en la línea T1 tuvo lugar un aumento de la producción de ES, en las líneas T2 y P5 disminuyó ligeramente.

En lo que se refiere a la composición estructural de los cultivos durante la fase de mantenimiento (Tabla 7), el genotipo tuvo una influencia significativa en el desarrollo de todos los tipos de ES (ESTr < 5 mm ( $P = 0,0000$ ), ESTr  $\geq$  5 mm ( $P = 0,0000$ ) y ESBO < 5 mm ( $P = 0,0186$ )), excepto en los ESBO  $\geq$  5 mm, en los que la producción fue, en general, muy baja. La crioconservación no afectó a la formación de ningún tipo de embrión. Solo en los ESTr  $\geq$  5 mm se apreció una interacción entre el genotipo y la crioconservación ( $P = 0,0138$ ). En este tipo de embriones, la congelación mejoró de forma importante la producción en la línea T1 (de 2,45 a 5,38 ES/cultivo), mientras que la disminuyó ligeramente en las líneas T2 y P5.



**Figura 36.** Incremento de peso fresco en cultivos embriogénicos control y procedentes de ES crioconservados (+NL) de las líneas T1, T2 y P5, después de un ciclo de cultivo en medio de mantenimiento.



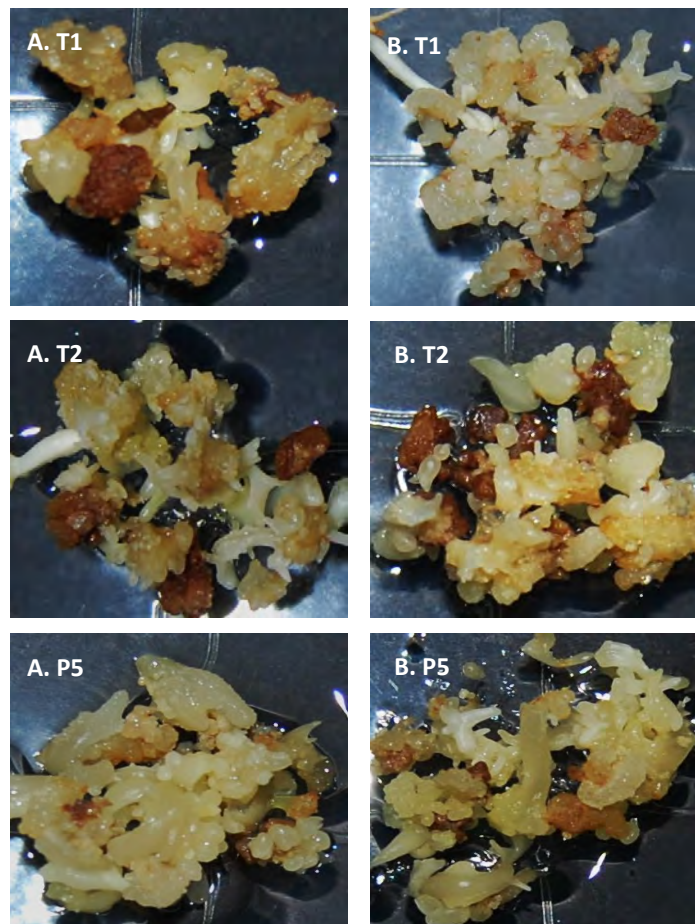
**Figura 37.** Producción de ES a partir de cultivos embriogénicos control y crioconservados (+NL) de las líneas T1, T2 y P5, después de un ciclo de cultivo en medio de mantenimiento.



**Tabla 7.** Efecto de la crioconservación sobre la producción en medio de mantenimiento de ES en diferentes estadios de desarrollo.

Línea embriogénica	ESTr < 5 mm		ESTr ≥ 5 mm		ESBO < 5 mm		ESBO ≥ 5 mm	
	Control	+NL	Control	+NL	Control	+NL	Control	+NL
T1	26,25a	31,00a	2,45c	5,38b	0,25b	0,54b	0,00b	0,08ab
T2	20,70b	18,65bc	2,85c	2,40c	0,85b	0,80b	0,00b	0,20ab
P5	16,15bc	15,20c	8,00a	6,10ab	0,9ab	1,75a	0,15ab	0,30a

Después de ocho semanas en medio de desarrollo de ES, el aspecto de los cultivos control y de los establecidos a partir de material crioconservado no presentó diferencias significativas (Fig. 38).

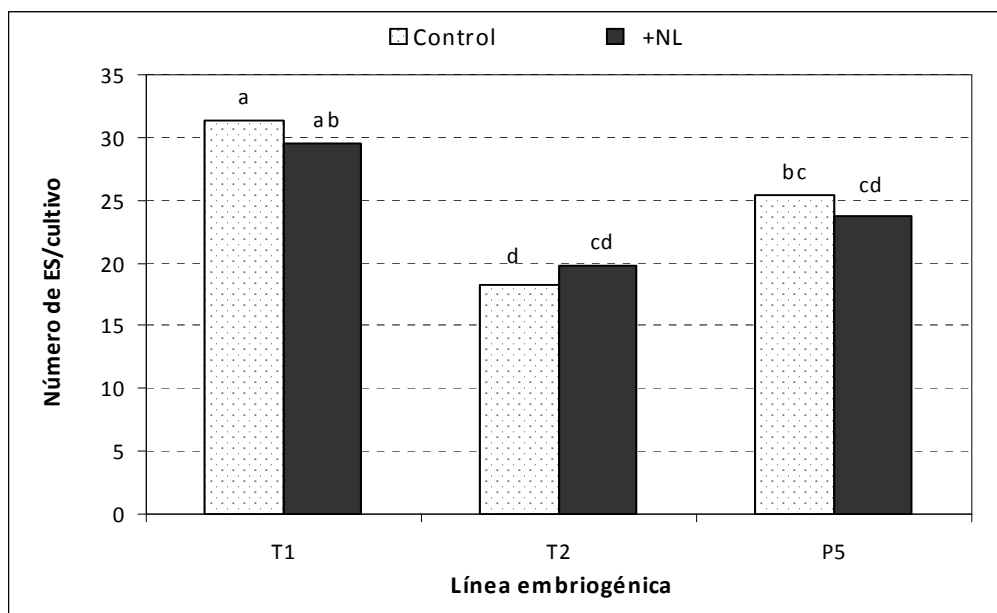


**Figura 38.** Aspecto de cultivos embriogénicos A) control y B) procedentes de ES crioconservados de las líneas T1, T2 y P5 después de un ciclo de cultivo en medio de desarrollo.

La producción total de ES durante la fase de desarrollo no se vio afectada de forma significativa por la crioconservación ni por la interacción de esta con el genotipo (Fig. 39). Solo



la línea tuvo una influencia estadísticamente significativa ( $P = 0,0000$ ) sobre el proceso.



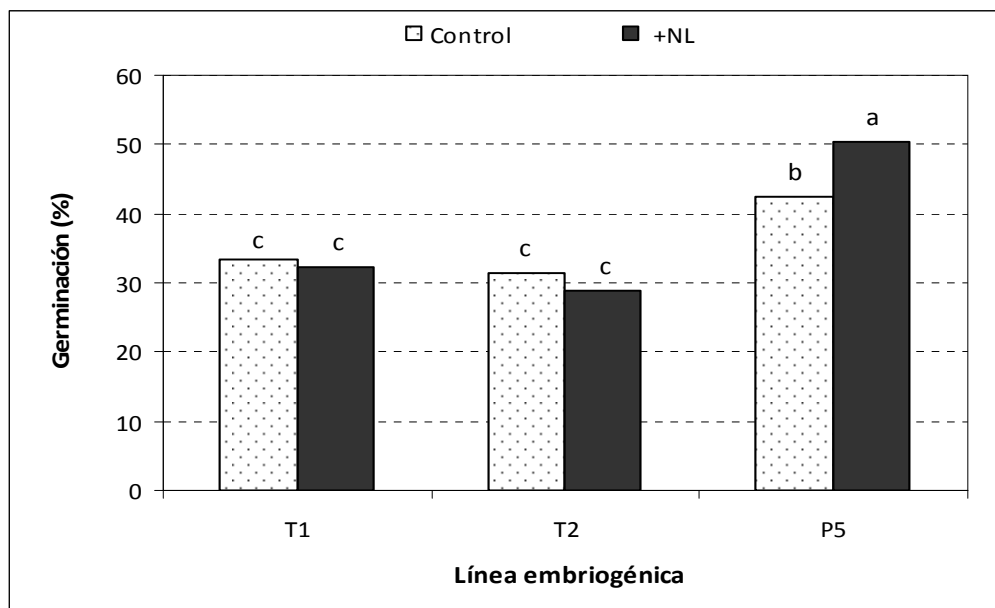
**Figura 39.** Producción de ES a partir de cultivos embriogénicos control y crioconservados (+NL) de las líneas T1, T2 y P5, después de un ciclo de cultivo en medio de desarrollo.

El tipo de ES producidos tampoco se vio influenciado por la crioconservación (Tabla 8). Únicamente en  $ESTr \geq 5$  mm se observó un efecto significativo ( $P = 0,0274$ ) de la interacción genotipo x crioconservación.

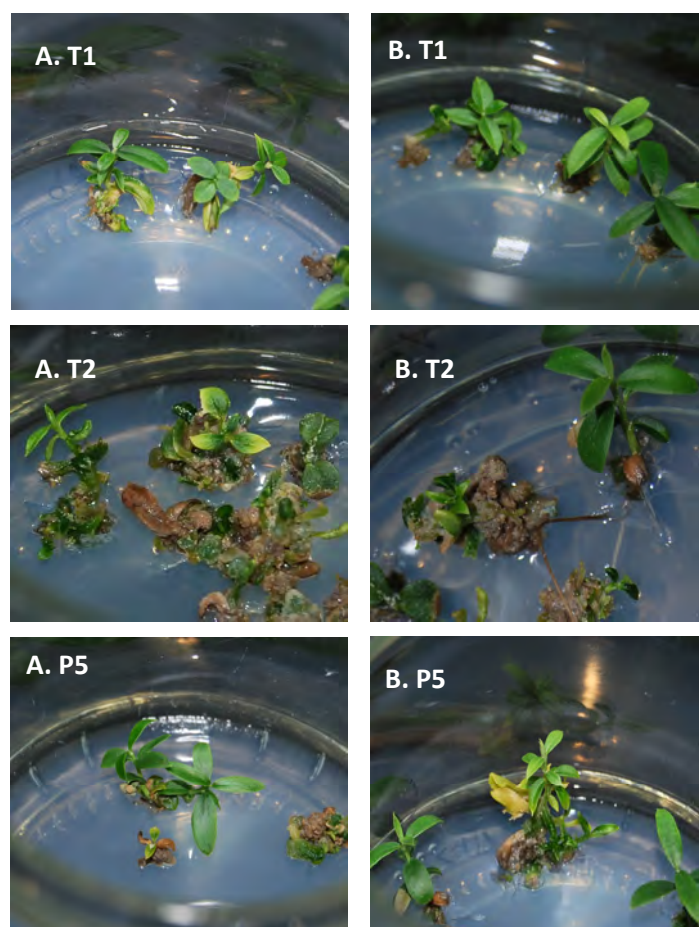
**Tabla 8.** Efecto de la crioconservación sobre la producción en medio de desarrollo de ES en diferentes estadios de desarrollo.

Línea embriogénica	ESTr < 5 mm		ESTr ≥ 5 mm		ESBO < 5 mm		ESBO ≥ 5 mm	
	Control	+NL	Control	+NL	Control	+NL	Control	+NL
T1	21,60a	21,06a	7,68b	7,03b	1,38ab	0,83ab	0,68c	0,54c
T2	7,05d	9,33cd	5,97b	6,23b	1,68a	1,54a	3,55a	2,72b
P5	16,21b	11,85c	7,15b	10,40a	1,27ab	0,65b	0,73c	0,78c

Durante la fase de germinación, el análisis estadístico reveló una influencia significativa de la línea ( $P = 0,0087$ ), la crioconservación ( $P = 0,0000$ ) y la interacción línea x crioconservación ( $P = 0,0056$ ) (Fig. 40). Mientras que en las líneas T1 y T2 los embriones procedentes de cultivos crioconservados mostraron tasas de germinación ligeramente más bajas que los controles, en la línea P5 se observó un aumento significativo de la germinación, del 40,39 al 52,34%. Las plántulas obtenidas presentaron buen aspecto en todos los casos (Fig. 41).

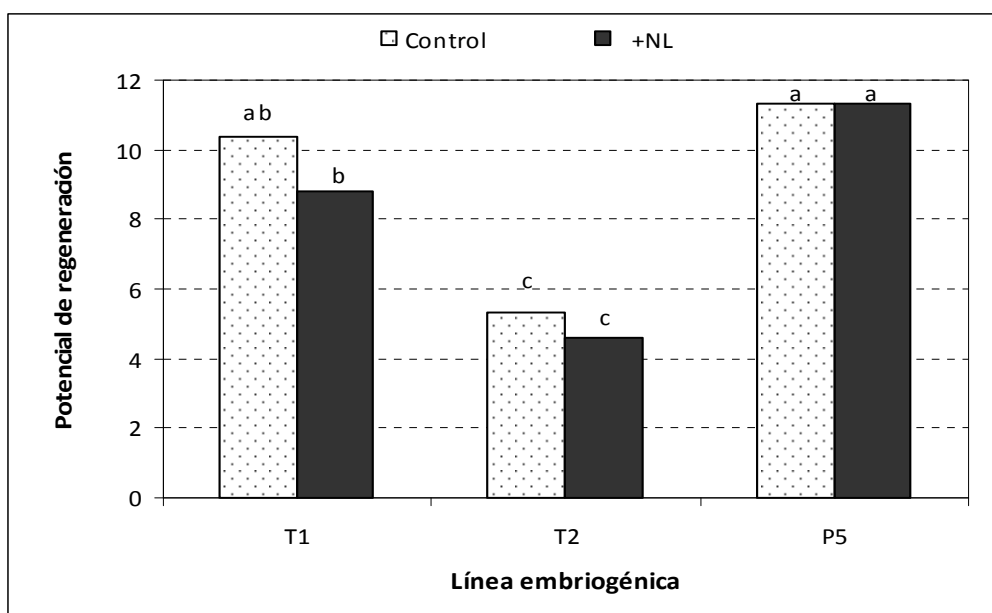


**Figura 40.** Germinación de ES de las líneas T1, T2 y P5 procedentes de cultivos control y crioconservados (+NL).



**Figura 41.** Plántulas de olivo procedentes de la germinación de ES desarrollados a partir de cultivos A) control y B) crioconservados de las líneas T1, T2 y P5.

El proceso de crioconservación no afectó de forma significativa al potencial de regeneración de los cultivos (Fig. 42) ni al número de tallos obtenidos por ES germinado (Tabla 9). En ambos casos, solo fue evidente un efecto significativo del genotipo ( $P = 0,0000$  y  $P = 0,0012$  para el potencial de regeneración y el número de tallos, respectivamente). Sin embargo, la longitud de los tallos formados durante la germinación estuvo determinada por el proceso de crioconservación ( $P = 0,0190$ ), además de por la línea ( $P = 0,0012$ ) (Tabla 9). Aunque en diferente grado, la crioconservación provocó en todos los genotipos un aumento de la longitud de los brotes desarrollados.



**Figura 42.** Potencial de regeneración de cultivos control y crioconservados (+NL) de las líneas T1, T2 y P5.

**Tabla 9.** Efecto de la crioconservación sobre el número de brotes formados por ES desarrollado a partir de cultivos control y crioconservados (+NL) de las líneas T1, T2 y P5, así como sobre la longitud de los mismos.

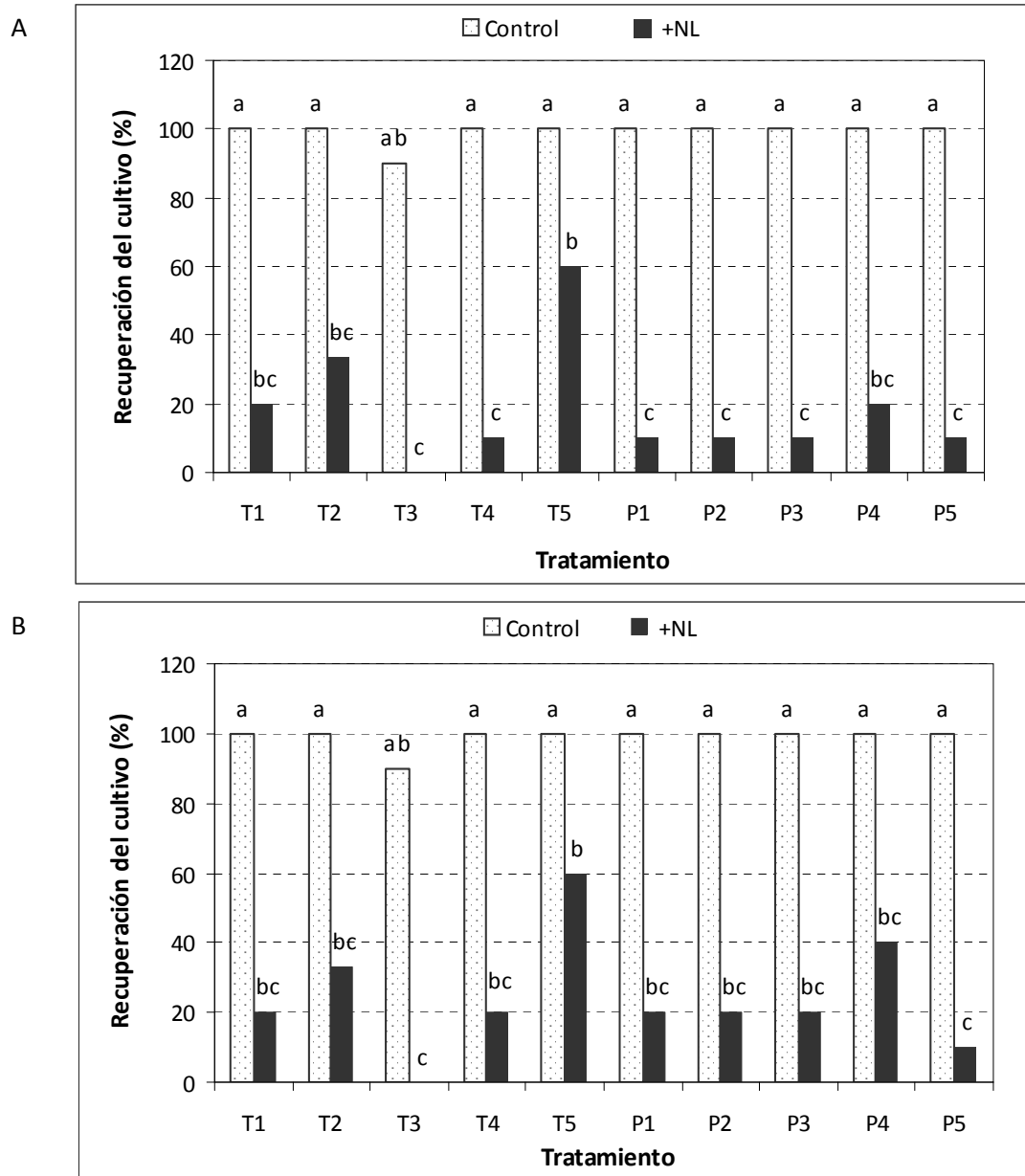
Línea embriogénica	Número de brotes/ES germinado		Longitud de los brotes	
	Control	+NL	Control	+NL
T1	0,21c	0,28b	1,32c	1,64c
T2	0,12d	0,11d	0,69d	0,74d
P5	0,65a	0,70a	4,46b	5,16a

### III.3.5. Aplicabilidad del método de crioconservación a distintas líneas embriogénicas

La respuesta a la crioconservación fue muy variable dependiendo del genotipo. Mientras que en algunas líneas los primeros signos de supervivencia se observaron 14-15 días después de la descongelación, en otros no fueron evidentes hasta 34 días después.

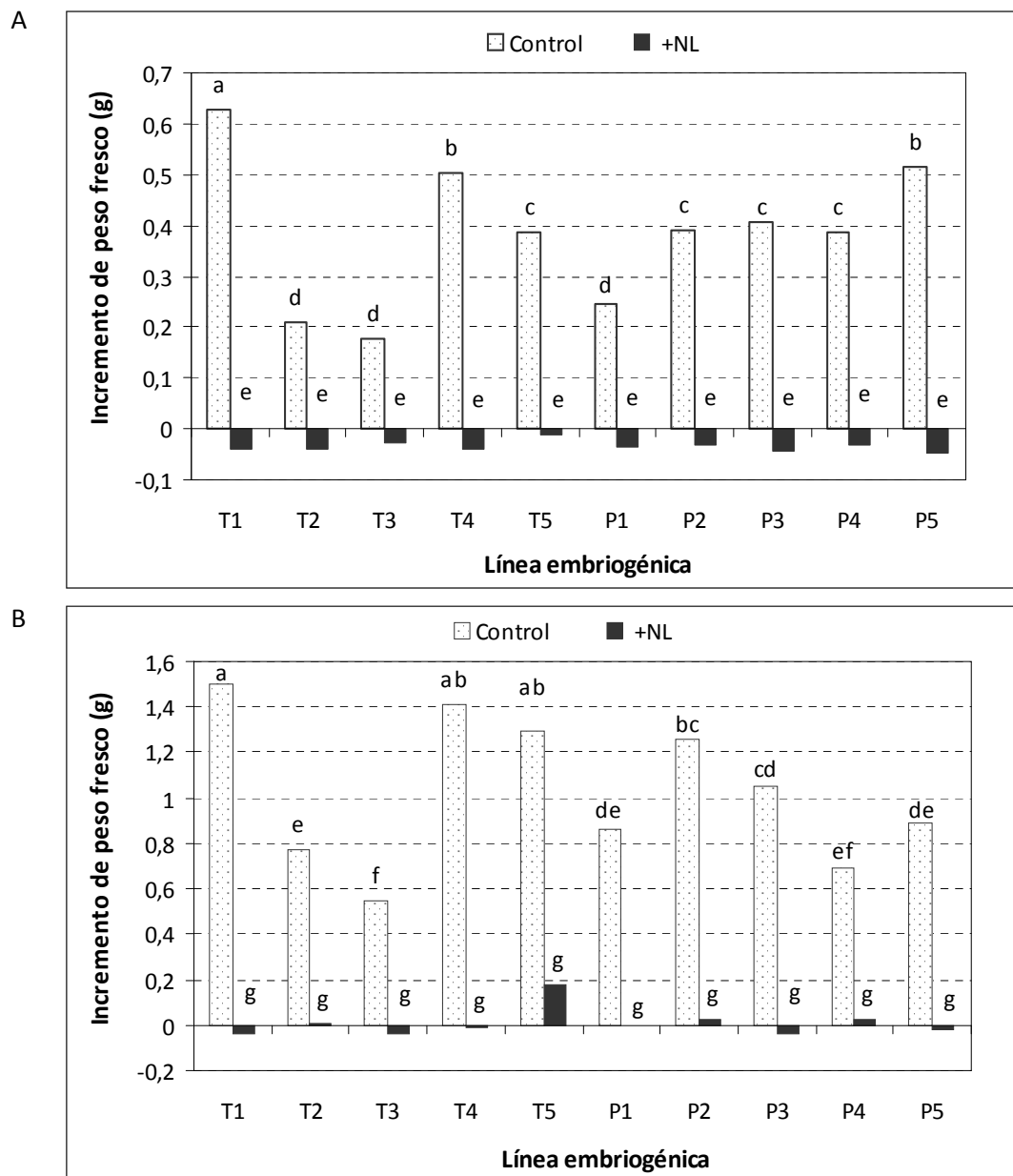
La tasa de recuperación del cultivo después de la congelación varió dependiendo del

genotipo (Fig. 43). Los mejores resultados se obtuvieron en la línea T5, en la que el 60% de los explantos dio lugar a cultivos embriogénicos después de la descongelación. Las líneas T3 y P5 mostraron los niveles de recuperación muy bajos, con un 0 y un 10%, respectivamente.

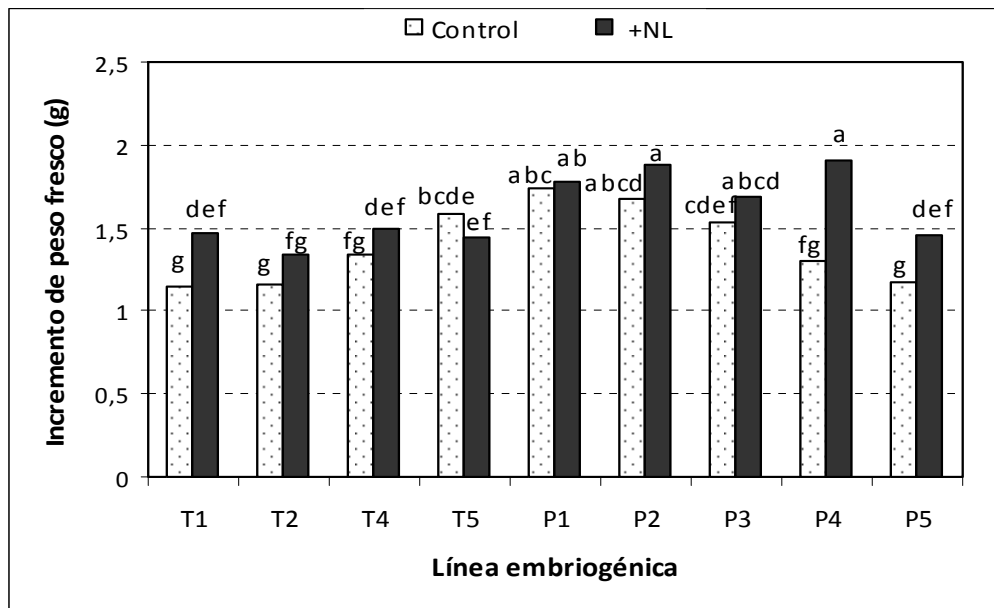


**Figura 43.** Recuperación del cultivo en muestras no tratadas (control) y crioconservadas (+NL) procedentes de distintas líneas embriogénicas. Datos tomados A) 6 y B) 12 semanas después del tratamiento.

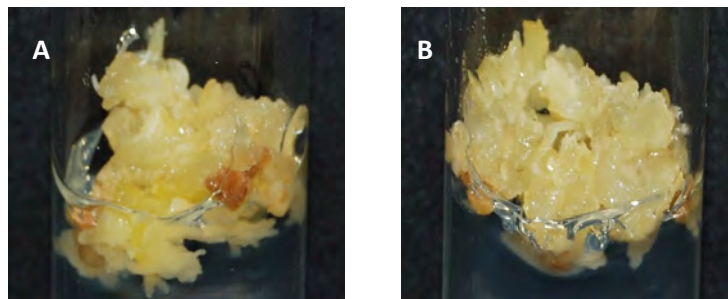
La proliferación de los ES se vio drásticamente afectada por el proceso de crioconservación, con incrementos de peso después de la descongelación muy bajos en todos los casos muy bajos (Fig. 44). Sin embargo, a largo plazo, la crioconservación no tuvo un efecto negativo sobre la proliferación de los cultivos (Fig. 45). Así, 4,5 meses después de la descongelación, la tasa de crecimiento de todas las líneas, con excepción de T5, fue más elevada en los cultivos crioconservados. El aspecto de los cultivos también fue similar, dando lugar al mismo tipo de estructuras embriogénicas (Fig. 46).



**Figura 44.** Incremento de peso fresco en muestras no tratadas (control) y crioconservadas (+NL) procedentes de distintas líneas embriogénicas. Datos tomados A) 6 y B) 12 semanas después del tratamiento.



**Figura 45.** Incremento de peso fresco en cultivos no tratados (control) y crioconservados (+NL) de diferentes líneas embriogénicas. Datos tomados 4,5 meses después de la descongelación.

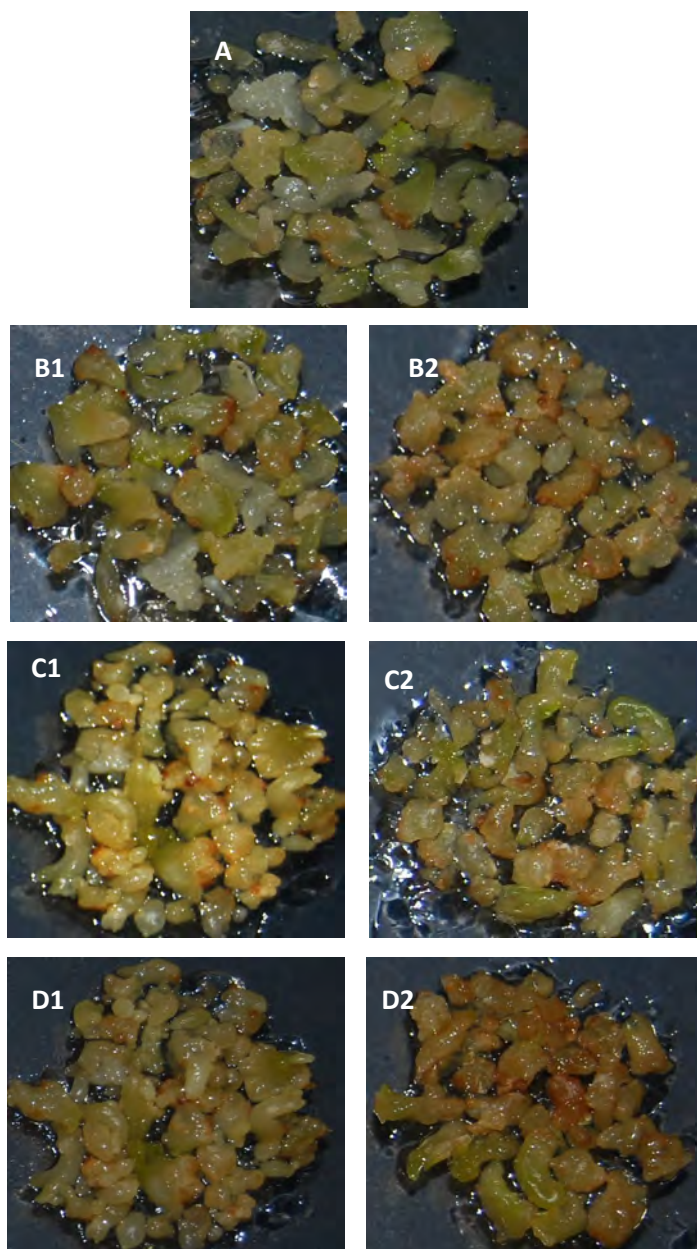


**Figura 46.** Aspecto general de cultivos embriogénicos A) control y B) crioconservados de la línea P2 en medio de proliferación, 4,5 meses después de la descongelación.

### III.3.6. Efecto de un precultivo a corto plazo con distintas concentraciones de sacarosa en medio sólido y líquido

En el presente experimento se testó el efecto de un precultivo durante 1, 3 y 7 días con distintas concentraciones de sacarosa (0,2 y 0,4 M) en medio sólido y líquido.

El tratamiento a corto plazo en medios de cultivo con alta concentración de sacarosa no perjudicó el aspecto general de los cultivos (Fig. 47 y 48). No obstante, después de 7 días en medio sólido con 0,4 M sacarosa se observó un leve oscurecimiento de los mismos (Fig. 47).



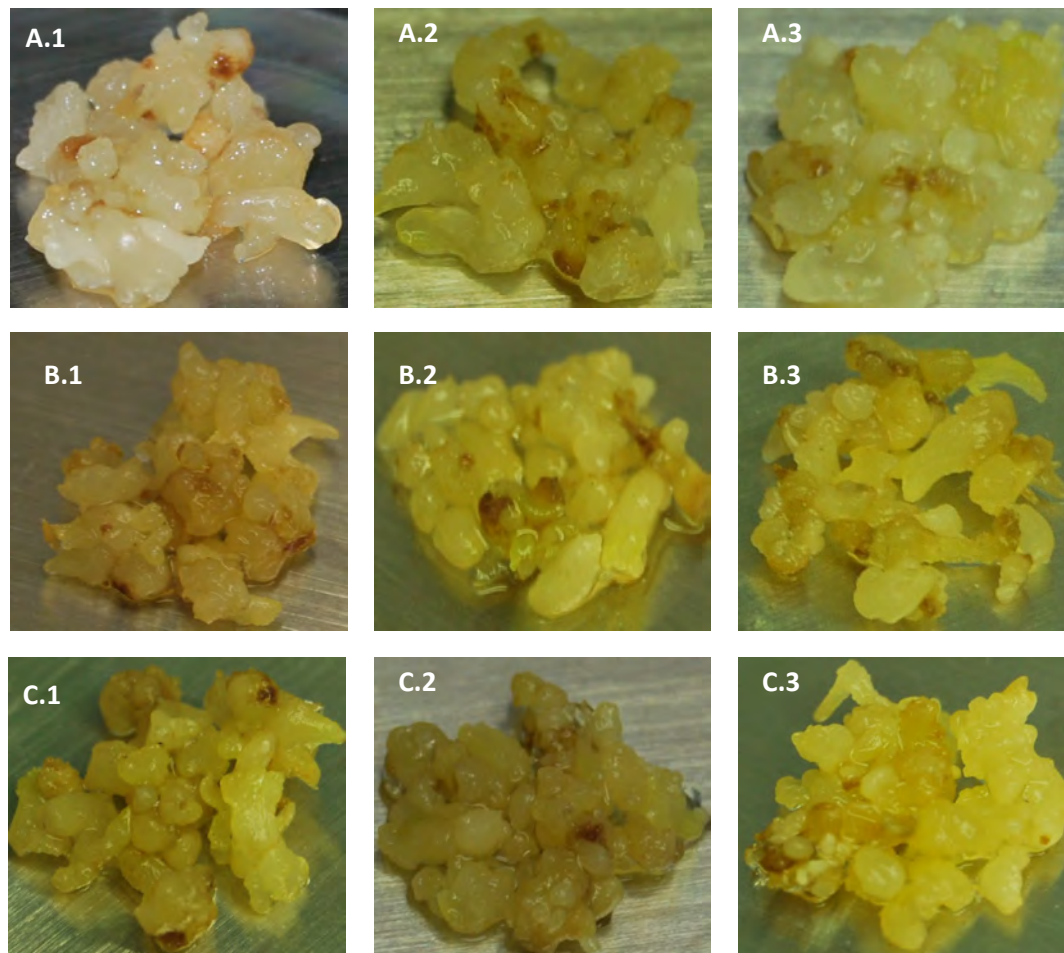
**Figura 47.** Aspecto de ES de olivo después de un precultivo en medio sólido con alta concentración de sacarosa. Cultivos control no tratados (A), tratados con 0,2 M sacarosa durante 1 (B1), 3 (C1) y 7 días (D1) o con 0,4 M sacarosa durante 1 (B2), 3 (C2) y 7 días (D2).

Doce semanas después del subcultivo en medio de proliferación, la tasa de crecimiento de los controles no tratados se vio influenciada de forma significativa por el tratamiento con sacarosa ( $P = 0,0000$ ), el método de cultivo ( $P = 0,0003$ ) y la interacción entre ambos factores ( $P = 0,0035$ ) (Fig. 49). En general, los cultivos procedentes de medio sólido presentaron tasas de crecimiento más elevadas que aquellos a los que el tratamiento con sacarosa se les aplicó en medio líquido. A partir de 3 días, la incubación en medio sólido con 0,2 M de sacarosa favoreció el crecimiento de los ES, dando lugar a los 7 días a valores de incremento de peso significativamente más elevados que en el control (1,47 g frente a 1,13 g) (Fig. 49A). La incubación en medio sólido con 0,4 M sacarosa redujo en todos los casos la tasa de crecimiento.

En medio líquido, el tratamiento con sacarosa disminuyó el crecimiento de los ES, independientemente del tiempo de incubación y de la concentración aplicada (Fig. 49B). Este



efecto negativo fue más pronunciado en los tratamientos con 0,4 M de sacarosa. No obstante, ninguno de los tratamientos testados afectó a la supervivencia ni a la capacidad embriogénica de los cultivos (Fig. 50).



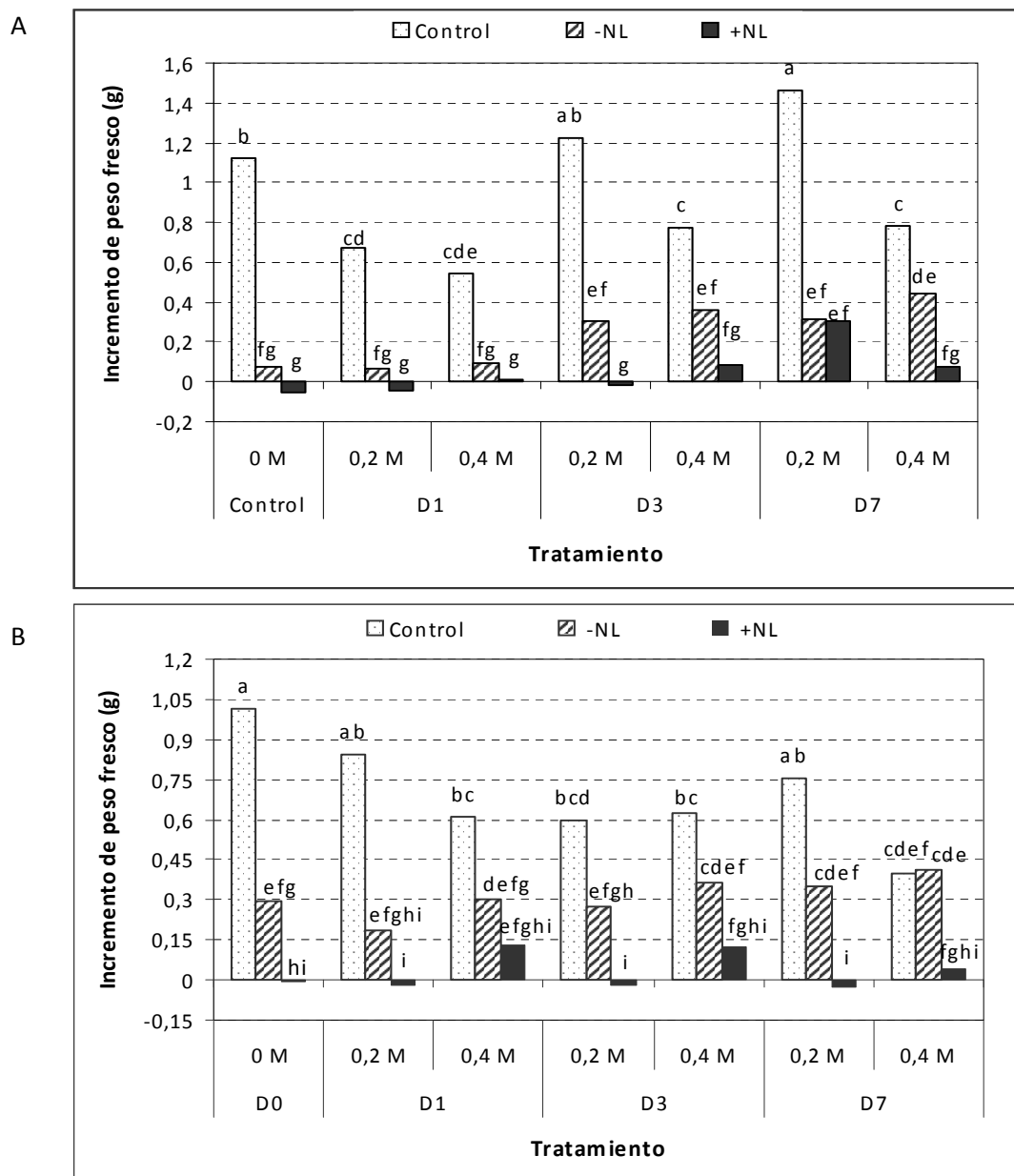
**Figura 48.** Aspecto de ES de olivo después de un precultivo durante (A) 1, (B) 3 ó (C) 7 días en medio ECO líquido control (1) o suplementado con (2) 0,2 ó (3) 0,4 M sacarosa.

El análisis estadístico no reveló un efecto significativo del tratamiento con sacarosa ni del método de cultivo sobre la sensibilidad de los explantos a las soluciones crioprotectoras (-NL) (Fig. 49 y 50). No obstante, en los cultivos tratados durante 7 días en medio sólido con 0,4 M sacarosa se obtuvieron incrementos de peso significativamente más elevados que en el control (Fig. 49). En general, fue evidente una alta sensibilidad a estas soluciones, pero la incubación en medio líquido durante 3 y 7 días con 0,4 M de sacarosa permitió que los embriones superaran la incubación con LS y PVS2 sin una disminución significativa de su crecimiento.

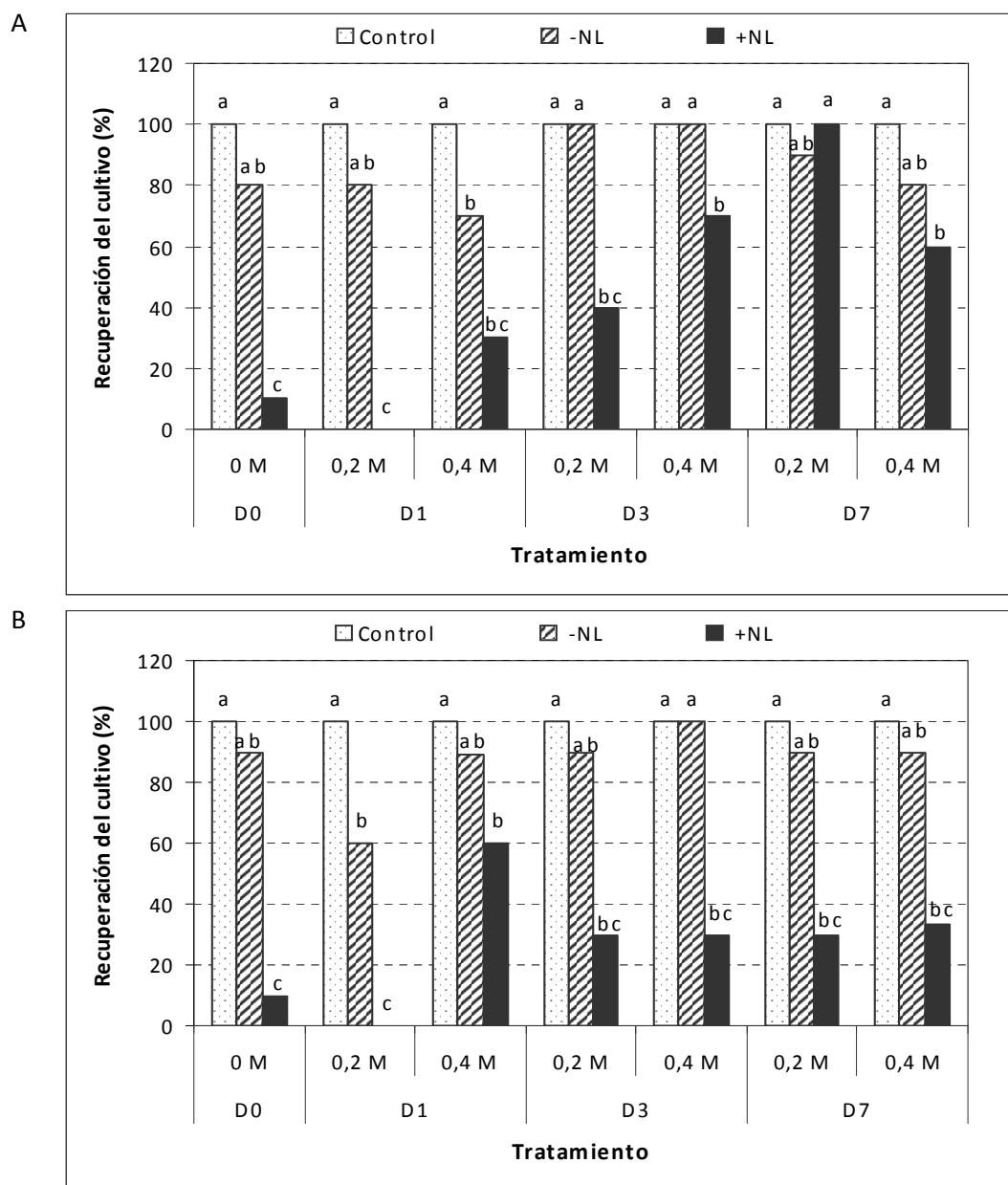
El tratamiento con sacarosa y el método de cultivo afectaron de forma significativa la respuesta de los ES a la crioconservación (Fig. 49 y 50). La tasa de recuperación de los cultivos también se vio afectada significativamente ( $P = 0,0191$ ) por la interacción entre el tratamiento con sacarosa y el método de cultivo. Mientras que en medio sólido los mejores resultados se obtuvieron con explantos tratados 7 días con 0,2 M sacarosa, con un 100% de los cultivos recuperados, en medio líquido el tratamiento óptimo fue 1 día con 0,4 M sacarosa, con un 60% de los cultivos recuperados. En ambos tratamientos se apreció también un adelanto de la respuesta, observándose los primeros signos de recuperación 14 días después de la descongelación frente a los 25 días necesarios en el caso de los explantos no tratados con



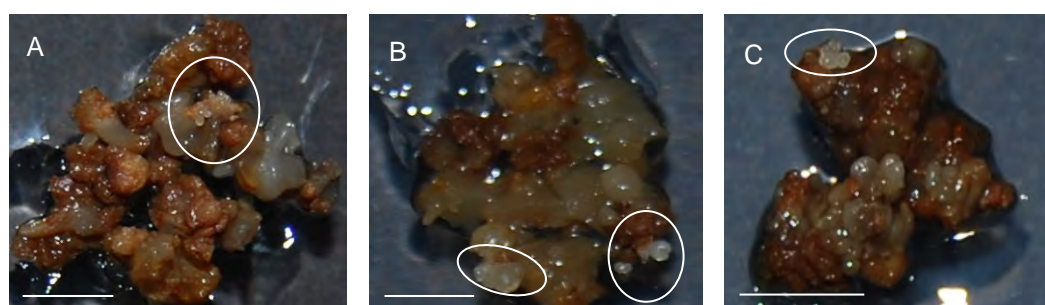
sacarosa (Fig. 51).



**Figura 49.** Incremento de peso fresco en muestras no tratadas (control), tratadas con soluciones crioprotectoras pero no congeladas (-NL) y crioconservadas (+NL) después de diferentes precultivos con sacarosa en medio A) sólido o B) líquido. Datos tomados 12 semanas después del tratamiento.



**Figura 50.** Recuperación del cultivo en muestras no tratadas (control), tratadas con soluciones crioprotectoras pero no congeladas (-NL) y crioconservadas (+NL) después de diferentes precultivos con sacarosa en medio A) sólido o B) líquido. Datos tomados 12 semanas después del tratamiento.



**Figura 51.** Primeros signos de crecimiento en explantos A) control, no tratados con sacarosa, B) tratados 7 días en medio sólido con 0,2 M sacarosa y C) durante 1 día en medio líquido con 0,4 M sacarosa. Barra = 5 mm.

### III.3.7. Efecto de un precultivo a largo plazo en medio sólido con distintas concentraciones de sacarosa

El cultivo de los ES en medios con alta concentración de sacarosa durante 42 días provocó un claro deterioro de su aspecto (Fig. 52), consistente en un oscurecimiento de los mismos y, en algunos casos, la aparición de síntomas de necrosis. Este efecto se dio antes y fue más pronunciado en los medios suplementados con 0,4 M de sacarosa. No obstante, después de un tiempo pudo observarse nuevo crecimiento, formado por ES en estado globular y callo de características embriogénicas.



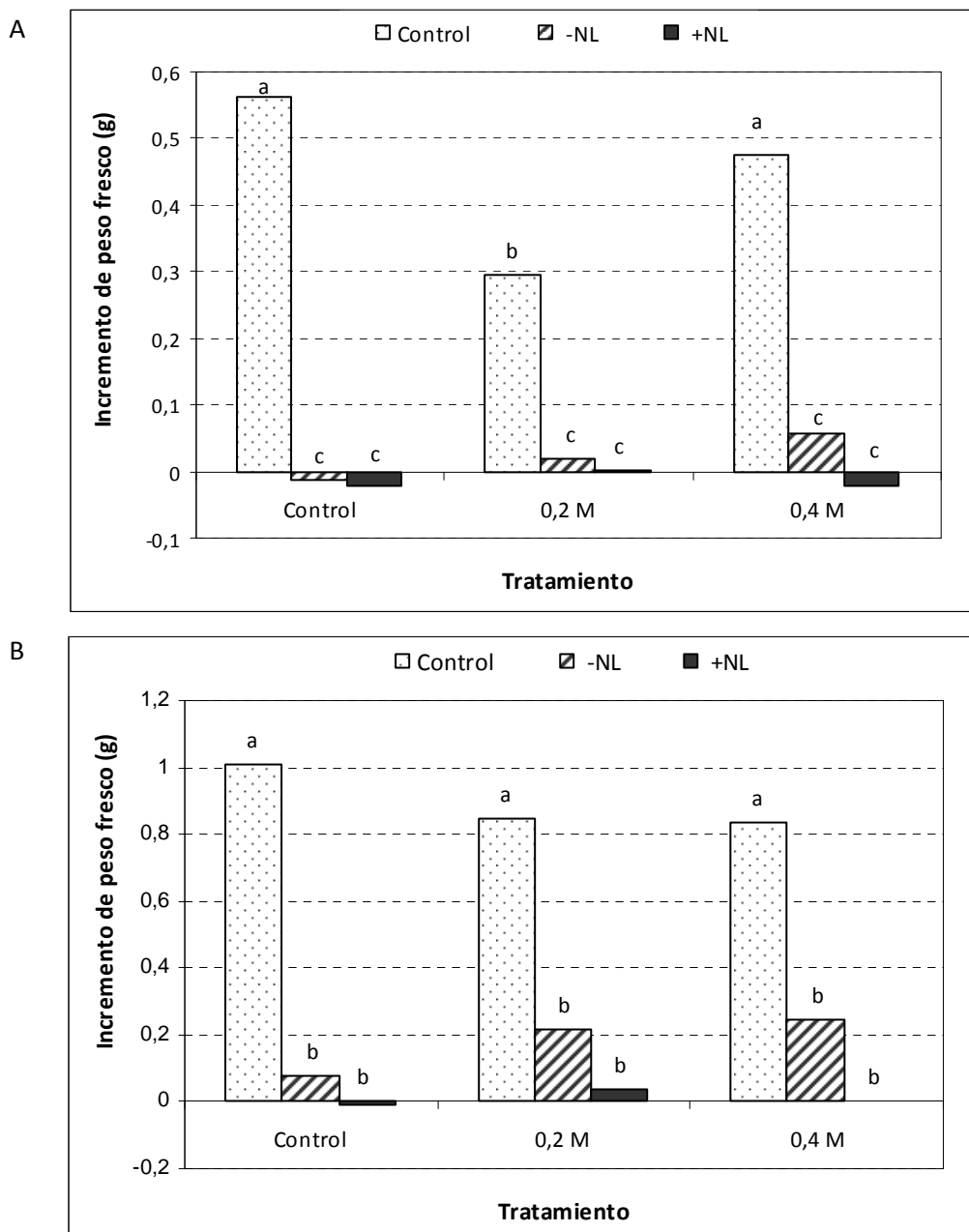
**Figura 52.** Aspecto de ES de olivo después de 42 días en medio sólido A) estándar o suplementado con B) 0,2 ó C) 0,4 M sacarosa.

El tratamiento a largo plazo con altas concentraciones de sacarosa provocó una disminución de la tasa de crecimiento (Fig. 53). Seis semanas después del subcultivo en medio de proliferación, el incremento de peso de los embriones tratados con 0,2 M de sacarosa fue significativamente más bajo que el de los embriones no tratados. No obstante, seis semanas más tarde estas diferencias dejaron de ser estadísticamente significativas. El precultivo con altas concentraciones de sacarosa no afectó a la capacidad embriogénica de los cultivos (Fig. 54).

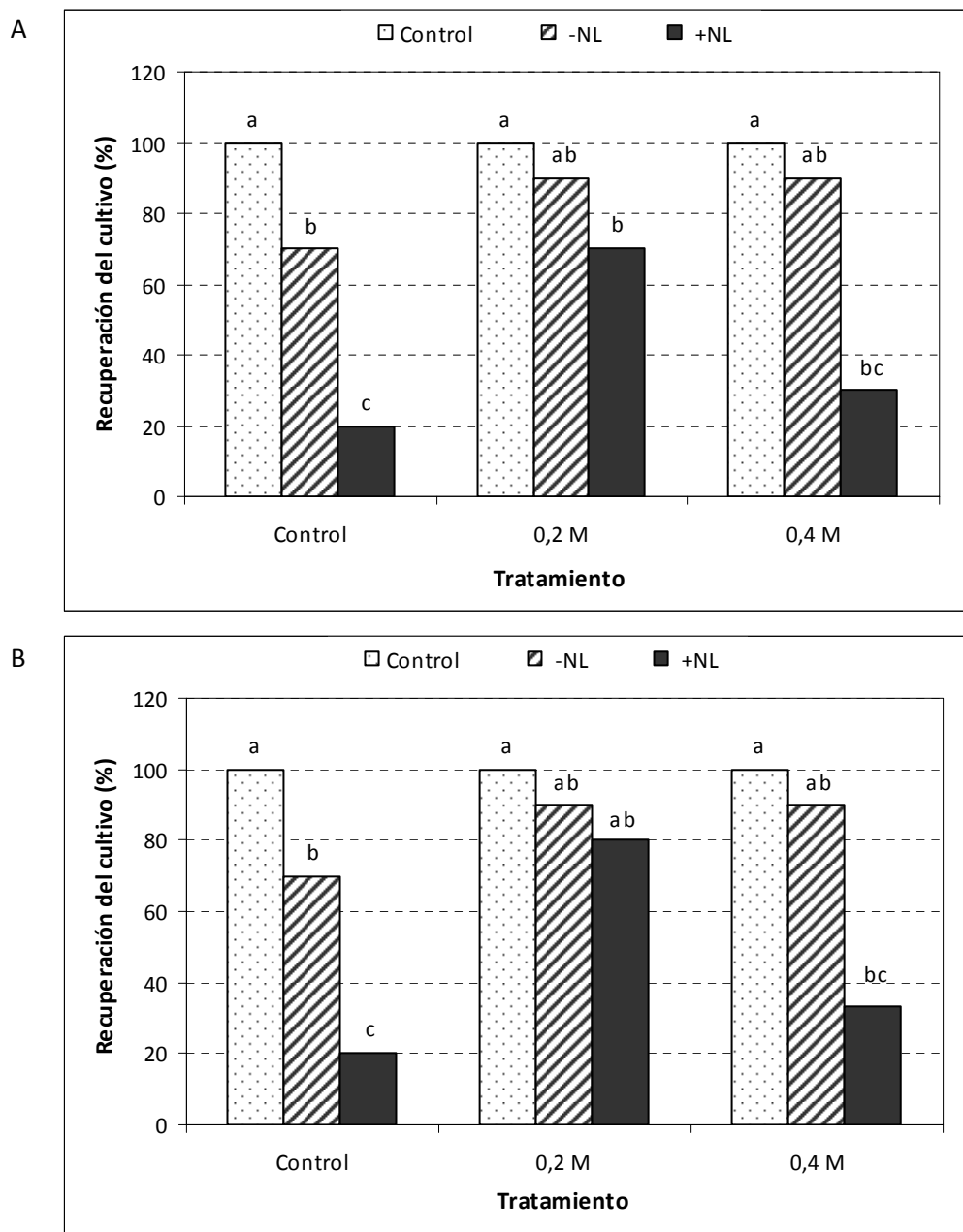
El tratamiento con sacarosa no tuvo un efecto significativo sobre la tolerancia de los embriones a las soluciones crioprotectoras, no provocando diferencias en el porcentaje de recuperación de los cultivos (Fig. 54) ni en la tasa de crecimiento (Fig. 53) de los diferentes controles no tratados (-NL).

No obstante, el precultivo durante 42 días en medio con 0,2 M sacarosa mejoró la respuesta de los ES a la crioconservación, con valores de recuperación del cultivo significativamente ( $P = 0,0149$ ) más elevados que en los controles (80% frente a 20%) (Fig. 54). En los embriones tratados con 0,4 M de sacarosa se obtuvieron valores intermedios (33,33%), estadísticamente iguales a los obtenidos en el control.

El precultivo a largo plazo con altas concentraciones de sacarosa no adelantó la respuesta de los cultivos después de la descongelación.



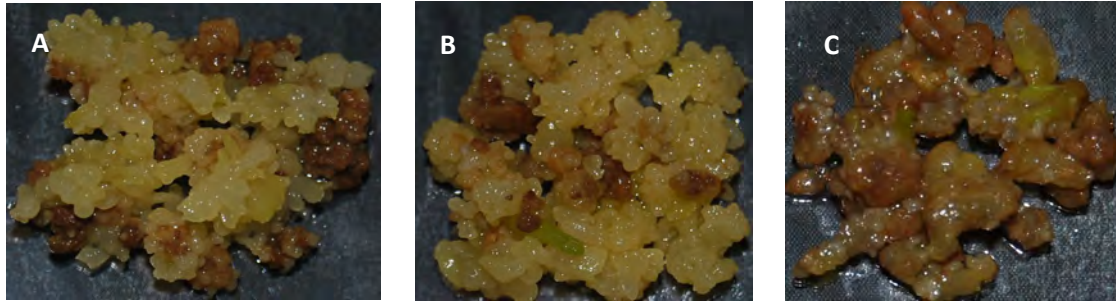
**Figura 53.** Incremento de peso fresco en muestras no tratadas (control), tratadas con soluciones crioprotectoras pero no congeladas (-NL) y crioconservadas (+NL) después de un precultivo a largo plazo con sacarosa en medio sólido. Datos tomados A) 6 y B) 12 semanas después del tratamiento.



**Figura 54.** Recuperación del cultivo en muestras no tratadas (control), tratadas con soluciones crioprotectoras pero no congeladas (-NL) y crioconservadas (+NL) después de un precultivo a largo plazo con sacarosa en medio sólido. Datos tomados A) 6 y B) 12 semanas después del tratamiento.

### III.3.8. Efecto de un precultivo a largo plazo en medio líquido con distintas concentraciones de sacarosa

Los ES cultivados durante 28 días en medio líquido suplementado con sacarosa presentaron diferente aspecto dependiendo de la concentración de azúcar (Fig. 55). Mientras que los cultivos tratados con 0,2 M sacarosa mostraron buena apariencia, incluso mejor que el control, los procedentes de medio con 0,4 M sacarosa presentaron un aspecto muy deteriorado, con claros síntomas de necrosis.



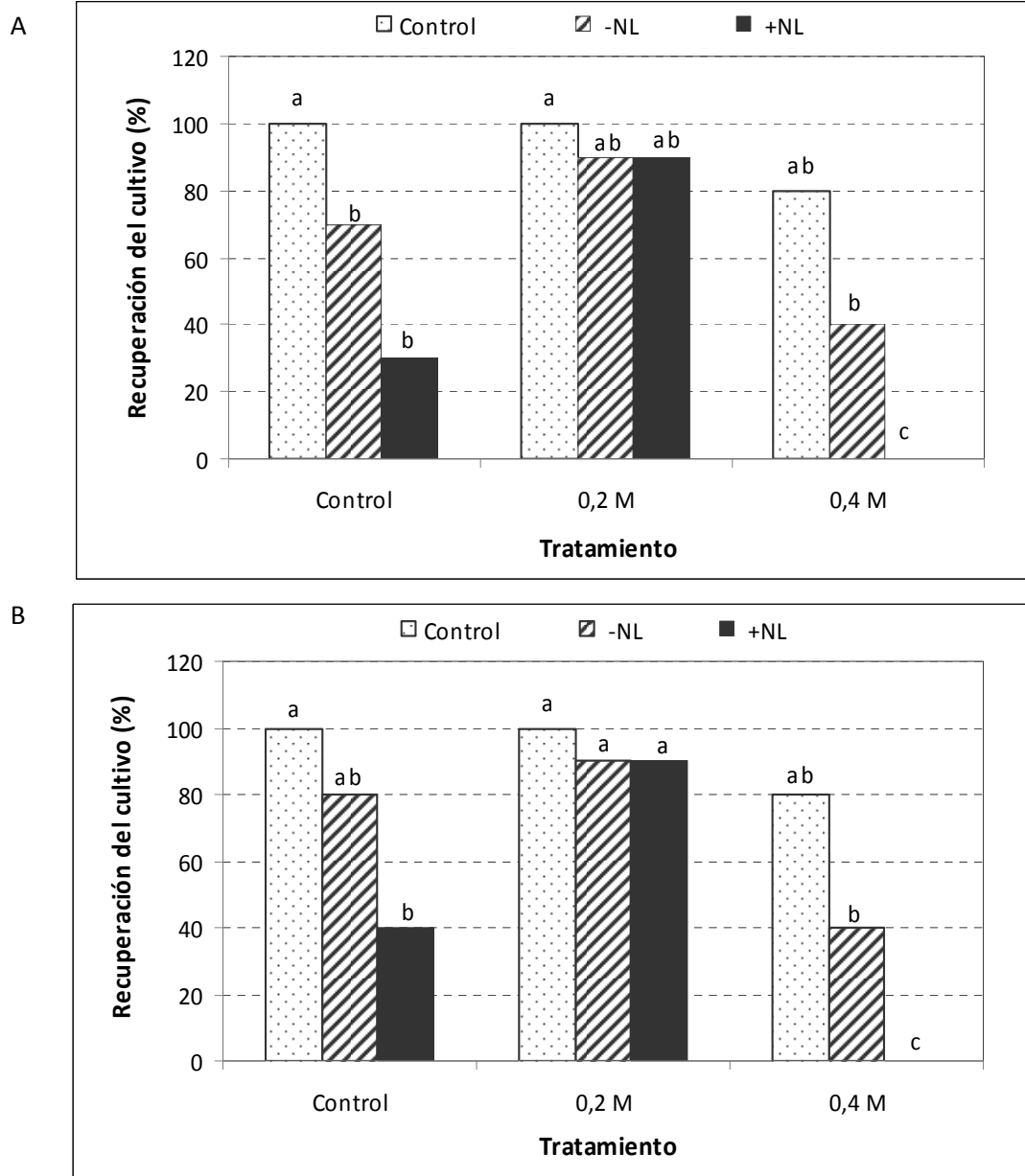
**Figura 55.** Aspecto de ES de olivo después de 28 días en medio líquido A) estándar o suplementado con B) 0,2 ó C) 0,4 M sacarosa.

El tratamiento con sacarosa afectó al comportamiento de los explantos después de su transferencia a medio de proliferación. Aunque la incubación durante 28 días en medio con 0,4 M sacarosa provocó una ligera disminución de la supervivencia (Fig. 56), los datos de incremento de peso pusieron de manifiesto un aumento de la proliferación, mayor al aumentar la concentración de sacarosa (Fig. 57).

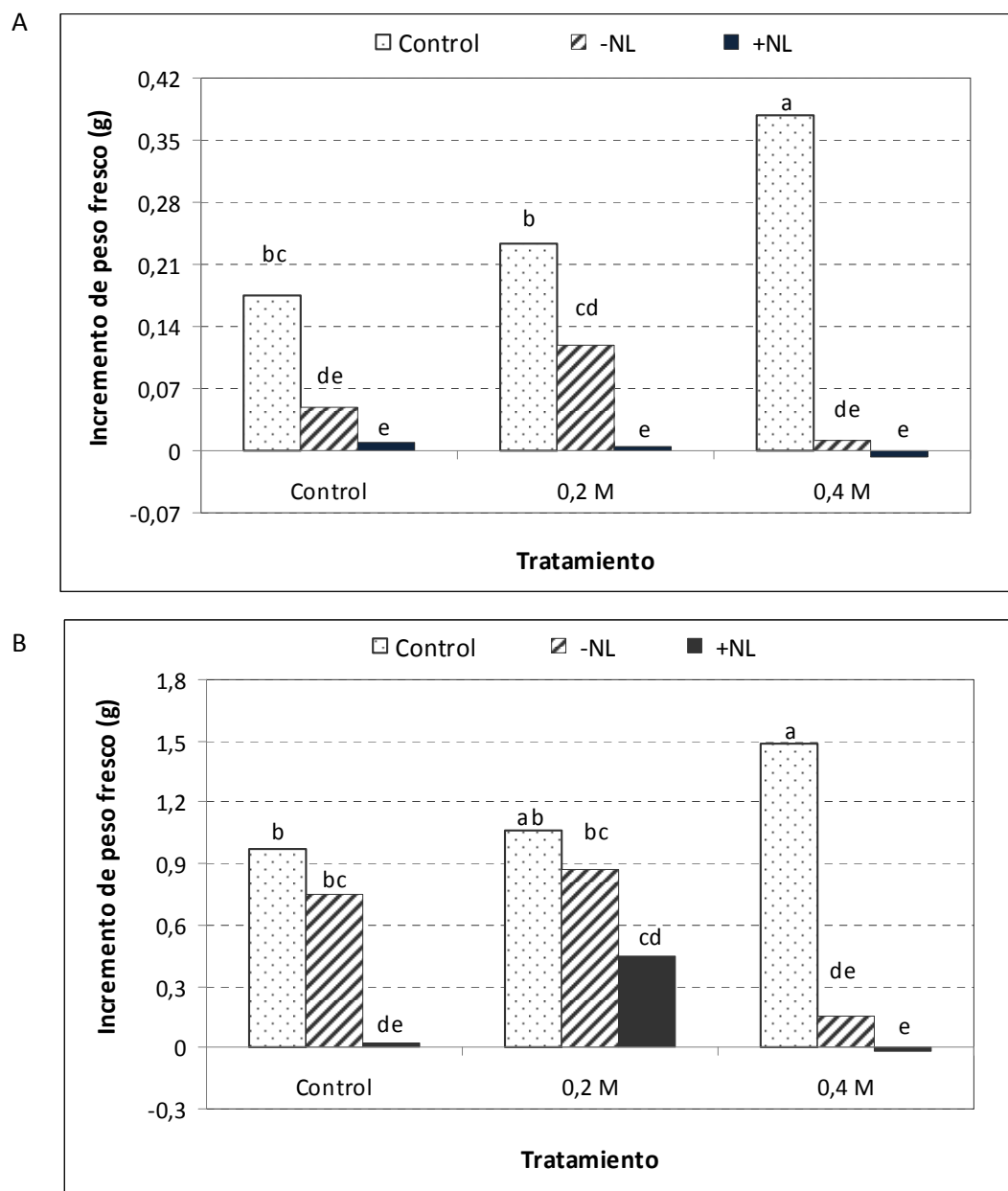
El precultivo con sacarosa no mejoró estadísticamente la tolerancia a las soluciones crioprotectoras aunque el tratamiento con 0,2 M sacarosa aumentó ligeramente tanto la recuperación del cultivo (Fig. 56) como el crecimiento de los explantos (Fig. 57).

El precultivo en medio líquido con altas concentraciones de sacarosa tuvo un efecto significativo ( $P = 2,630 \cdot 10^{-5}$ ) sobre la respuesta de los explantos a la crioconservación, con un aumento de la recuperación de los cultivos, de un 40% en los explantos control a un 90% en los tratados con 0,2 M sacarosa (Fig. 56). Además, los cultivos obtenidos a partir de los ES sometidos a este tratamiento presentaron un aspecto considerablemente mejor que los desarrollados a partir de explantos no tratados (Fig. 58). La incubación con 0,4 M sacarosa resultó perjudicial, ya que ningún explanto procedente de este tratamiento sobrevivió a la congelación.

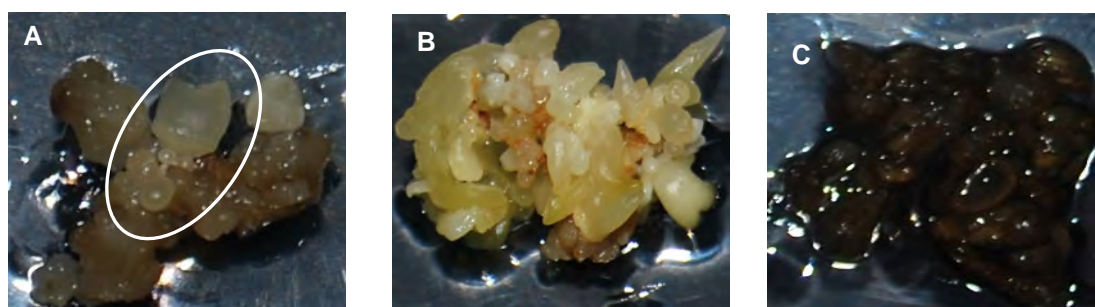
El precultivo con 0,2 M sacarosa en medio líquido durante 28 días también aceleró la respuesta de los explantos crioconservados. Tres días después de la descongelación ya se apreciaron signos evidentes de recuperación, frente a los 18 días necesarios para observar algún tipo de crecimiento en los embriones no tratados.



**Figura 56.** Recuperación del cultivo en muestras no tratadas (control), tratadas con soluciones crioprotectoras pero no congeladas (-NL) y crioconservadas (+NL) después de un precultivo a largo plazo con sacarosa en medio líquido. Datos tomados A) 6 y B) 12 semanas después del tratamiento.



**Figura 57.** Incremento de peso fresco en muestras no tratadas (control), tratadas con soluciones crioprotectoras pero no congeladas (-NL) y crioconservadas (+NL) después de un precultivo a largo plazo con sacarosa en medio líquido. Datos tomados A) 6 y B) 12 semanas después del tratamiento.



**Figura 58.** Efecto de un precultivo a largo plazo en medio líquido con sacarosa sobre el aspecto de los cultivos doce semanas después de la crioconservación: (A) explanto no tratado, (B) tratado con 0,2 M sacarosa o (C) con 0,4 M sacarosa.



### III.3.9. Influencia de la crioconservación y de un pretratamiento con sacarosa sobre la embriogénesis somática

En el presente experimento se estudió el efecto que la inclusión del pretratamiento óptimo con sacarosa podía provocar en la embriogénesis somática. Para ello, se comparó el comportamiento en las distintas fases de este proceso de cultivos control no crioconservados, cultivos establecidos a partir de ES crioconservados sin tratamiento previo y cultivos establecidos a partir de ES crioconservados después de 7 días en medio ECO sólido suplementado con 0,2 M sacarosa.

Cuatro meses y medio después de la congelación, el aspecto de los cultivos en medio de proliferación fue muy similar, no apreciándose diferencias significativas (Fig. 59).

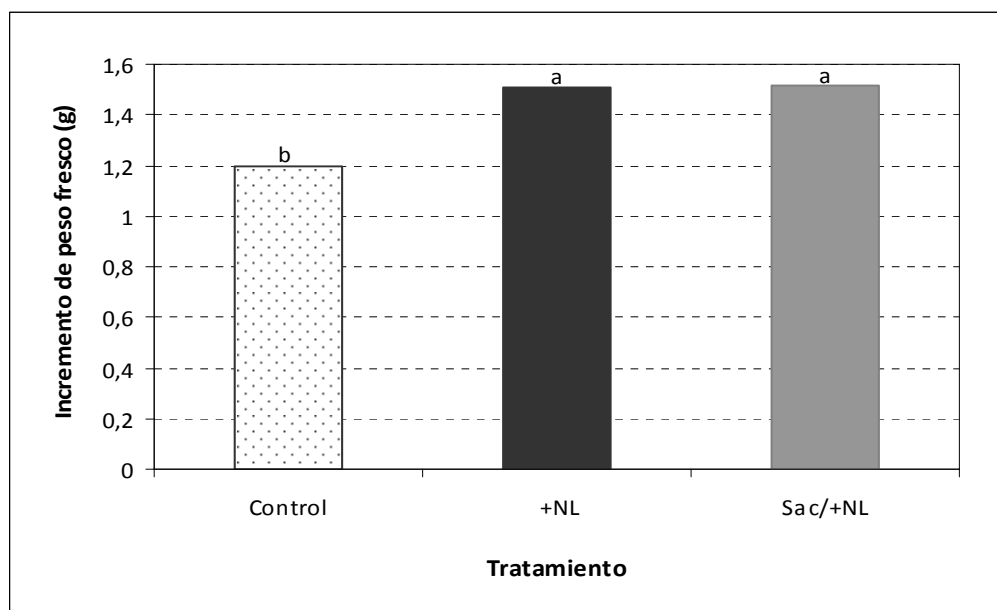


**Figura 59.** Aspecto en medio de mantenimiento de cultivos embriogénicos A) control o establecidos a partir de ES crioconservados B) sin o C) con tratamiento previo con 0,2 M sacarosa.

La proliferación de los cultivos se vio afectada positivamente ( $P = 0,0008$ ) por la crioconservación aumentando los valores de incremento de peso de 1,20 g en los cultivos control a 1,51 y 1,52 g en los crioconservados, con o sin tratamiento previo con sacarosa (Fig. 60). El pretratamiento con 0,2 M de sacarosa no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de los cultivos después de la congelación.

En lo que se refiere a los ES producidos durante la fase de mantenimiento, no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos (datos no mostrados). Los valores oscilaron entre 25,35 ES/cultivo en los cultivos tratados con sacarosa y congelados y 29,22 ES/cultivo en los congelados sin tratamiento previo.

La composición estructural de los cultivos cambió como consecuencia del tratamiento con sacarosa (Tabla 10). La formación de ESTr < 5 mm disminuyó de forma significativa ( $P = 0,0166$ ). Sin embargo, el número de ESTr ≥ 5 mm y ESBO ≥ 5 mm aumentó ligeramente en los cultivos procedentes de explantos pretratados. No se observaron diferencias en la producción de ESBO < 5 mm.



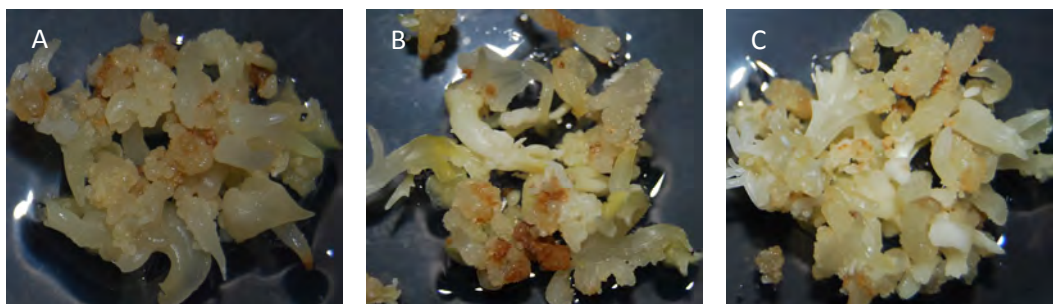
**Figura 60.** Incremento de peso fresco en cultivos embriogénicos control y procedentes de ES crioconservados, con (Sac/+NL) o sin tratamiento previo con sacarosa (+NL), después de un ciclo de cultivo en medio de mantenimiento.

**Tabla 10.** Efecto de la crioconservación y de un precultivo con sacarosa sobre la producción en medio de mantenimiento de ES en diferentes estadios de desarrollo.

Tratamiento	ESTr < 5 mm	ESTr ≥ 5 mm	ESBO < 5 mm	ESBO ≥ 5 mm
Control	23,46a	4,00b	0,05a	0,05a
+NL	25,03a	6,05ab	0,46a	0,05a
Sac/+NL	18,15b	7,05a	0,46a	0,33a

Durante la fase de maduración no se apreciaron diferencias en el aspecto general de los cultivos (Fig. 61). La producción de ES fue similar en todos los casos, aunque valores ligeramente más elevados se obtuvieron en cultivos procedentes de ES pretratados y congelados (26,49 ES/cultivo frente a 23,35 y 24,33 ES/cultivo en cultivos control y crioconservados, respectivamente) (datos no mostrados).

En lo que se refiere al tipo de embriones producidos, el análisis estadístico solo mostró un efecto significativo del tratamiento con sacarosa en los ESBO ≥ 5 mm (Tabla 11). No obstante, provocó un ligero aumento de la producción de ESTr ≥ 5 mm y ESBO < 5 mm.

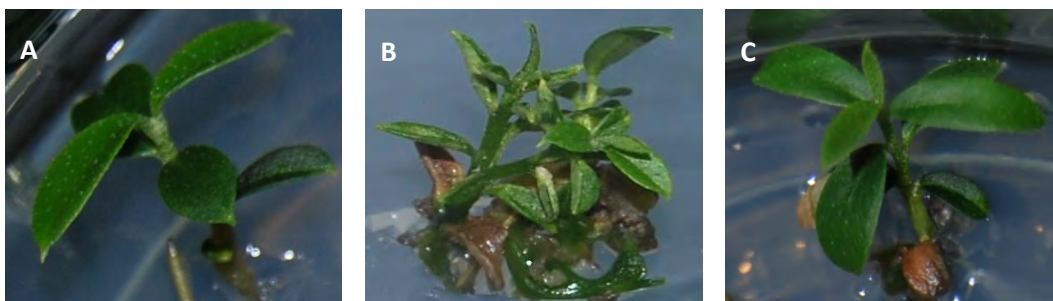


**Figura 61.** Aspecto en medio de maduración de cultivos embriogénicos A) control o establecidos a partir de ES crioconservados B) sin o C) con tratamiento previo en medio ECO sólido con 0,2 M sacarosa.

**Tabla 11.** Efecto de la crioconservación y de un precultivo con sacarosa sobre la producción en medio de maduración de ES en diferentes estadios de desarrollo.

Tratamiento	ESTr < 5 mm	ESTr ≥ 5 mm	ESBO < 5 mm	ESBO ≥ 5 mm
Control	14,46a	6,95a	0,78b	3,05b
+NL	12,50a	8,40a	1,58ab	2,98b
Sac/+NL	12,26a	9,21a	2,46a	5,92a

ES procedentes de cultivos embriogénicos control o establecidos a partir de ES crioconservados, con o sin tratamiento previo con sacarosa, fueron transferidos a condiciones de germinación. Después de dos recultivos de 6 semanas cada uno, no se observaron diferencias significativas en las tasas de germinación obtenidas, que oscilaron entre el 18,87 y el 21,03% (datos no mostrados). Las plántulas obtenidas mostraron buen aspecto en todos los casos (Fig. 62).



**Figura 62.** Plántulas de olivo procedentes de la germinación de ES desarrollados a partir de (A) cultivos control, (B) crioconservados y (C) crioconservados después de un tratamiento con 0,2 M sacarosa.

Al igual que el proceso de crioconservación, el pretratamiento con sacarosa provocó un ligero aumento del potencial de regeneración. Como consecuencia, los cultivos crioconservados después de un tratamiento con sacarosa presentaron un potencial de regeneración significativamente más elevado que los cultivos control (4,00 embriones por cultivo control iniciado en la fase de maduración que daban lugar a plántulas con tallo o tallo y raíz frente a 5,49 en cultivos procedentes de ES crioconservados después de un precultivo con sacarosa) (datos no mostrados). No se apreciaron diferencias significativas en el número de tallos obtenidos por ES germinado ni en la longitud de los mismos, que osciló entre 8,25 y 8,53 mm (datos no mostrados).

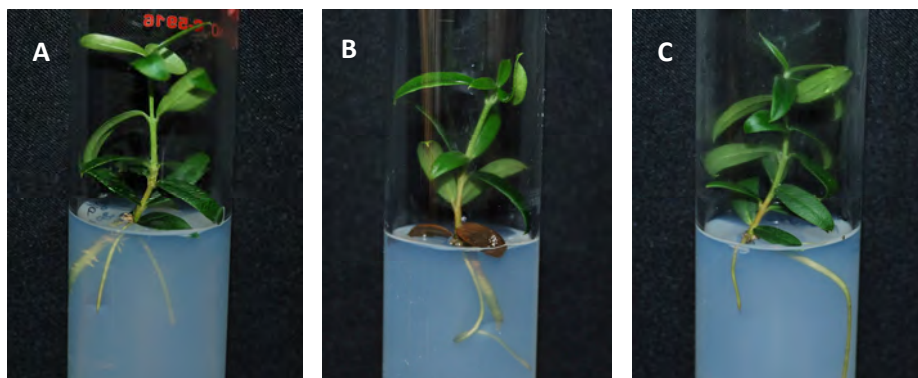
Las plantas obtenidas a partir de cultivos control y crioconservados, con o sin tratamiento previo con sacarosa, presentaron un aspecto similar en medio de multiplicación (Fig. 63).



**Figura 63.** Aspecto general en medio de multiplicación de plantas de olivo regeneradas a partir de A) cultivos control o establecidos a partir de ES crioconservados B) sin o C) con tratamiento previo con 0,2 M sacarosa.

El número de brotes formados durante la fase de multiplicación de los tallos obtenidos en la germinación de los ES no mostró diferencias debidas a la crioconservación o al pretratamiento con sacarosa (datos no mostrados). Tampoco se apreciaron diferencias en la longitud de los brotes desarrollados (datos no mostrados).

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados durante la fase de enraizamiento. Así, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de enraizamiento, que osciló entre un 42,86 y un 66,67%, en plantas control y procedentes de ES crioconservados, respectivamente. Tampoco se apreciaron diferencias en el número de raíces formadas o en la longitud de las mismas. Todas las plantas presentaron buen aspecto en medio de enraizamiento (Fig. 64).



**Figura 64.** Aspecto general en medio de enraizamiento de plantas de olivo regeneradas a partir de A) cultivos control o establecidos a partir de ES crioconservados B) sin o C) con tratamiento previo con 0,2 M sacarosa.



No se observó un efecto significativo de la crioconservación ni del precultivo con sacarosa sobre la capacidad de aclimatación de las plantas obtenidas (Fig. 65). En todos los casos, independientemente del tratamiento, se obtuvo un porcentaje de supervivencia del 100%.



**Figura 65.** Aspecto general en fase de aclimatación de plantas de olivo regeneradas a partir de A) cultivos control o establecidos a partir de ES crioconservados B) sin o C) con tratamiento previo con 0,2 M sacarosa.

### III.3.10. Efecto de un pretratamiento con sacarosa sobre la aplicabilidad del método de crioconservación a distintas líneas embriogénicas

Con el fin de mejorar la tasa de recuperación en algunas líneas, en el presente experimento se evaluó el efecto de un precultivo con sacarosa sobre la crioconservación de distintas líneas embriogénicas de olivo.

El tratamiento con sacarosa provocó en todas las líneas un adelanto de la respuesta después de la congelación, reduciendo de forma significativa los días necesarios para observar algún signo de crecimiento en los explantos congelados (Tabla 12).

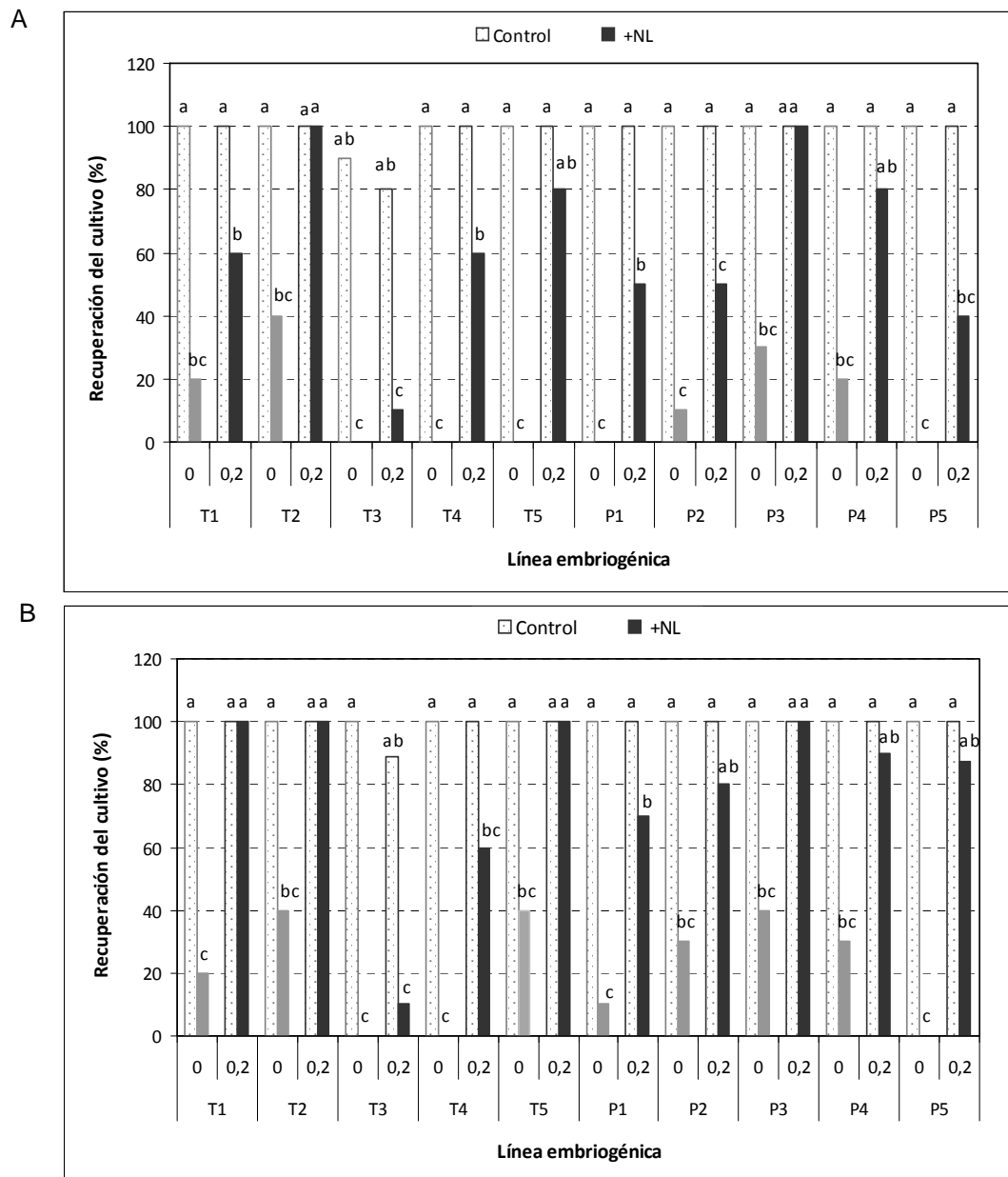
**Tabla 12.** Tiempo necesario para observar los primeros signos de supervivencia en ES de distintas líneas embriogénicas congelados con o sin tratamiento previo con sacarosa.

Línea embriogénica	Tiempo primeros signos supervivencia (días)									
	T1	T2	T3	T4	T5	P1	P2	P3	P4	P5
<b>+NL</b>	> 30	26	-	> 30	> 30	> 30	25	15	14	> 42
<b>Sac/+NL</b>	1	14	22	8	5	13	15	7	8	9

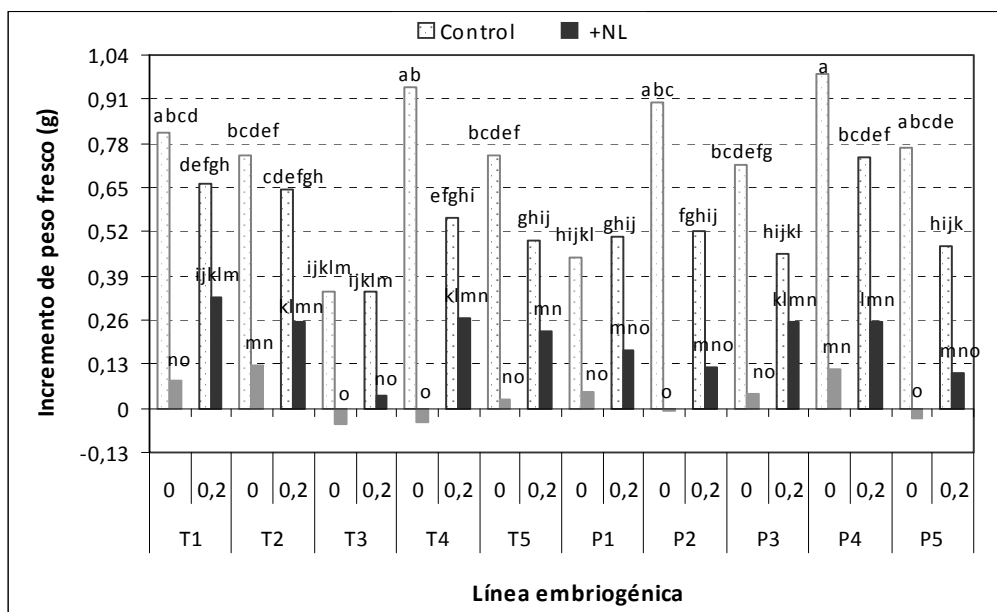
El precultivo con sacarosa tuvo un efecto positivo sobre la congelación mejorando significativamente ( $P = 1,11 \cdot 10^{-16}$ ) la recuperación del cultivo en todas las líneas testadas, excepto T3, T4, P2 y P4, en las que las diferencias no fueron significativas (Fig. 66). En general, las tasas de supervivencia y de recuperación obtenidas después de un pretratamiento durante 7 días con 0,2 M sacarosa fueron altas, oscilando entre el 60 y el 100%, excepto para la línea T3 donde solo se alcanzó un 10%. El genotipo también tuvo un efecto significativo ( $P =$

$3,187 \cdot 10^{-7}$ ) sobre la crioconservación, aunque no se observó ningún tipo de interacción entre ambos factores.

Excepto en las líneas T3 y P1, el precultivo con sacarosa afectó de forma negativa al crecimiento de los ES, con valores de incremento de peso más bajos en los controles tratados que en los no tratados (Fig. 67). La crioconservación también provocó un descenso significativo ( $P = 0,0000$ ) de la tasa de crecimiento de los cultivos, no observándose una influencia significativa de la línea. Sin embargo, los embriones crioconservados después de ser tratados con sacarosa presentaron tasas de crecimiento significativamente ( $P = 0,0000$ ) más elevadas que los no tratados.

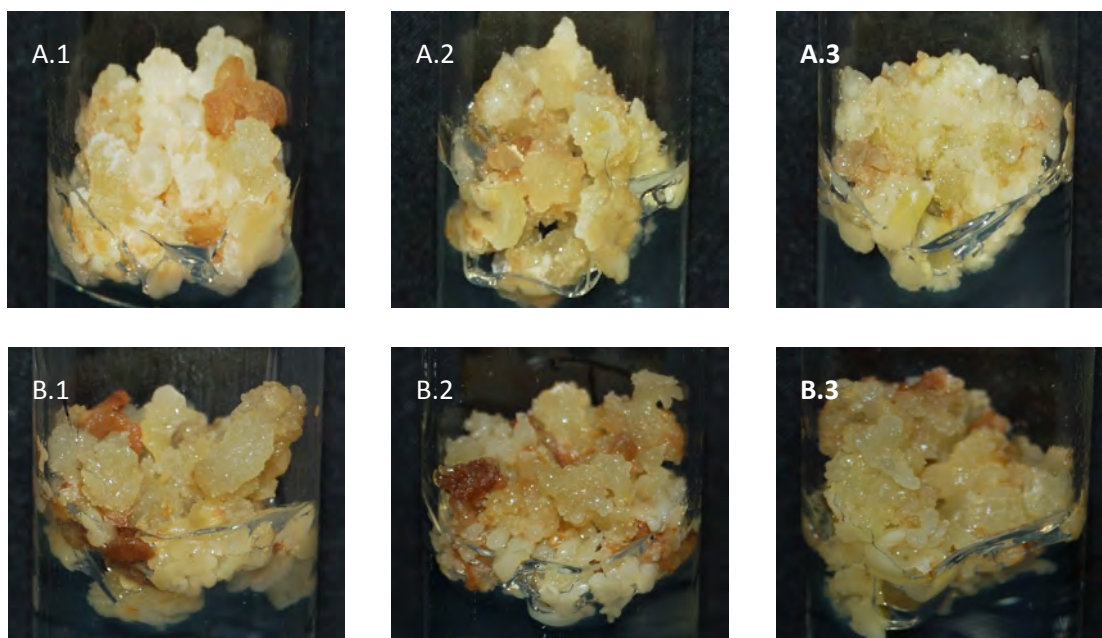


**Figura 66.** Efecto de un precultivo con sacarosa sobre la recuperación del cultivo en muestras no tratadas (control) y crioconservadas (+NL) procedentes de diferentes líneas embriogénicas. Datos tomados A) 6 y B) 12 semanas después del tratamiento.



**Figura 67.** Efecto de un precultivo con sacarosa sobre el incremento de peso fresco en muestras no tratadas (control) y crioconservadas (+NL) procedentes de diferentes líneas embriogénicas. Datos tomados 12 semanas después del tratamiento.

En general, no se observaron diferencias en el aspecto de los cultivos después de la crioconservación, con o sin tratamiento previo con sacarosa (Fig. 68).



**Figura 68.** Aspecto general de cultivos embriogénicos A) de una línea antigua (P4) y B) otra joven (T4) establecidos a partir del stock (1) o de ES crioconservados sin (2) o con tratamiento previo con sacarosa (3).

### III.4. Discusión

#### III.4.1. Efecto del tiempo en PVS2

En los protocolos basados en la vitrificación, los tejidos deben ser suficientemente deshidratados antes de su congelación en NL. En estos procedimientos, la etapa crítica para conseguir la supervivencia es generalmente la deshidratación (Engelmann 2004), debido a la toxicidad química y a los efectos hiperosmóticos que pueden resultar de una sobrexposición a las soluciones vitrificantes (Sakai *et al.* 2000). Encontrar un tiempo adecuado de incubación en PVS2 equivale a encontrar el equilibrio correcto entre la tolerancia a la deshidratación y una deshidratación adecuada, con un contenido hídrico lo suficientemente bajo como para que no se dé una disminución de la supervivencia como consecuencia de la formación de cristales de hielo.

Los resultados obtenidos revelaron que la incubación con PVS2 era necesaria para la crioconservación de ES de olivo. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los distintos tiempos de exposición testados, poniendo de manifiesto que en 30 min se pueden alcanzar niveles de deshidratación suficientes para la posterior congelación de los explantos.

El tratamiento de deshidratación óptimo puede variar considerablemente entre distintos genotipos, con diferencias en el contenido hídrico, la permeabilidad de la membrana y la sensibilidad a las soluciones crioprotectoras y, por lo tanto, debe ser establecido en cada caso (Takagi 2000). En *Quercus suber*, Valladares *et al.* (2004), tampoco encontraron diferencias significativas entre los distintos tiempos de incubación en PVS2 testados y, al igual que en la presente investigación, eligieron el tratamiento más corto (30 min) como el más pragmático. En ñame, los mejores resultados se obtuvieron tras un tiempo de incubación de 120 min (Sant *et al.* 2008). Martínez *et al.* (2003) obtuvieron un 70% de recuperación en cultivos embriogénicos de *Quercus robur* crioconservados tras 60 ó 90 min de incubación en PVS2. Corredoira *et al.* (2004) obtuvieron un 68% de embriogénesis tras crioconservar ES de *Castanea sativa* después de 60 min de incubación en PVS2. En cultivos embriogénicos de aguacate (Gúzman-García *et al.* 2013) y callo embriogénico de olivo (Sánchez-Romero *et al.* 2009), 60 min fue el tiempo óptimo de incubación en PVS2 mientras que en *Picea mariana* 30 min fueron suficientes para conseguir la supervivencia del 100% de los cultivos (Touchell y Chiang 2002).

Los ES de olivo mostraron una alta sensibilidad a las soluciones crioprotectoras utilizadas en el método de vitrificación en gota. No obstante, mientras que la exposición en LS solo afectó de forma significativa a la proliferación de los cultivos, los tratamientos con PVS2 influyeron drásticamente en la supervivencia y recuperación de los mismos. Estos resultados están de acuerdo con investigaciones previas llevadas a cabo en esta especie en las que se demostró que la tasa de proliferación de los tejidos organizados se vio significativamente afectada por la duración del tratamiento con PVS2 (Sánchez-Romero *et al.* 2009). Los efectos perjudiciales debidos a estas soluciones fueron más pronunciados en ES que en tejidos no organizados, debido probablemente a diferencias en la composición celular de los mismos (Sánchez-Romero *et al.* 2009). Los tejidos no organizados están compuestos por células típicamente embriogénicas que se caracterizan por presentar pequeño tamaño, división activa, núcleos relativamente grandes, citoplasma denso y vacuolas pequeñas. Probablemente, estas características hacen a estas células más resistentes a la desecación que las células diferenciadas y altamente vacuoladas (Engelmann 2004) presentes en los tejidos embriogénicos organizados.

A pesar del tratamiento con las soluciones crioprotectoras, la congelación provocó importantes daños en los ES crioconservados, dando lugar a tasas de recuperación del cultivo



que no superaron el 40%. Las tasas de proliferación obtenidas después de la congelación fueron en general muy bajas. No obstante, todos los explantos que 12 semanas después de la descongelación habían mostrado algún signo de supervivencia mantuvieron su capacidad proliferativa a lo largo del tiempo, dando lugar al establecimiento de nuevos cultivos.

En olivo, Lambardi *et al.* (2001) obtuvieron un 38% de supervivencia cuando incubaron en PVS2 durante 90 min ES en diferentes estadios de desarrollo. En callo embriogénico, sin embargo, se consiguió una supervivencia del 100% incubando los explantos en PVS2 durante 60 min (Sánchez-Romero *et al.* 2009).

#### III.4.2. Efecto del tipo de explanto utilizado en la crioconservación

La selección del estadio de desarrollo y el tamaño del material de inicio es un factor determinante que debe ser testado durante la puesta a punto de un protocolo de crioconservación (Sakai y Engelmann 2007). En esta línea, estudios previos llevados a cabo en cultivos embriogénicos de *Fraxinus* (Ozudogru *et al.* 2010), *Citrus* (Pérez 2000) y *Pinus* (Laine *et al.* 1992) revelaron que el estadio de desarrollo de los cultivos embriogénicos puede tener un papel importante en la respuesta a la crioconservación.

En olivo, el estadio de desarrollo de los explantos embriogénicos testados no afectó de forma significativa la recuperación del cultivo después de la crioconservación, obteniéndose tasas bajas de recuperación en todos los casos. Estos resultados difieren de investigaciones previas llevadas a cabo en alcornoque (Valladares *et al.* 2004) y aguacate (Guzmán-García *et al.* 2013), en las que el éxito de la crioconservación dependió de forma significativa del grado de diferenciación de los explantos utilizados. Aunque en algunos casos ES en estadios de desarrollo avanzados mostraron tasas de supervivencia más elevadas debido a la adquisición de tolerancia a la desecación (Fang *et al.* 2004), en general, los embriones en estadios tempranos dan mejores resultados (Bhojwani y Razdan 1996). Así, en aguacate, los porcentajes de recuperación más bajos se obtuvieron con ES de 3-4 mm, el explanto embriogénico testado con mayor grado de diferenciación (Guzmán-García 2013). En *Iris nigricans*, sin embargo, ES de 2-4 mm dieron lugar a tasas de supervivencia superiores a las de ES más pequeños (1-2 mm) o más grandes (4-6 mm) (Shibli 2000) y en *Cucumis melo*, los ES medianos y grandes mostraron tasas de supervivencia más elevadas que los pequeños (Shimonishi *et al.* 2000).

Tal y como revelan los resultados obtenidos, las bajas tasas de recuperación conseguidas después de la crioconservación fueron consecuencia tanto de la toxicidad de las soluciones crioprotectoras como de los daños causados por la congelación. En general se observó una alta sensibilidad a las soluciones crioprotectoras en todos los explantos testados. No obstante, los datos de supervivencia y de recuperación del cultivo revelaron diferencias significativas relacionadas con el estadio de desarrollo del material de partida, con un aumento de la sensibilidad conforme avanzó el desarrollo del embrión. Grenier-de-March *et al.* (2005) también describieron diferencias en la sensibilidad a las soluciones crioprotectoras según el estadio de desarrollo del embrión. La respuesta a los crioprotectores podría estar afectada por cambios importantes que ocurren durante la histodiferenciación como variaciones en el contenido hídrico, el nivel de vacuolización o el estado fisiológico. Además, de acuerdo con Valladares *et al.* (2004), la solución PVS2 deseca los embriones de distintos tamaños a una velocidad diferente, afectando de esta forma la supervivencia. Así, explantos en estadios de desarrollo diferentes pueden requerir tiempos de exposición a PVS2 distintos.

Aunque como se ha apuntado, en la presente investigación no se observaron diferencias significativas relacionadas con el tejido embriogénico utilizado como explanto para la

crioconservación, resultados ligeramente mejores se consiguieron con las muestras más heterogéneas: MP y una mezcla de ES en diferentes estadios de desarrollo. En aguacate también se obtuvieron buenos resultados utilizando una combinación de callo embriogénico y ES en estadios tempranos de desarrollo, debido probablemente a las características de este material de partida entre las que se incluyen pequeño tamaño, respuesta rápida y altas tasas de proliferación (Guzmán-García *et al.* 2013).

### III.4.3. Efecto del método de cultivo y de la fase de crecimiento de los cultivos

Los tejidos embriogénicos de olivo han sido previamente crioconservados usando diferentes técnicas (Shibli y Al-Juboory 2000; Lambardi *et al.* 2001; Sánchez-Romero *et al.* 2009; Lynch *et al.* 2011). Sin embargo, la información sobre el método de cultivo y el momento en el que se mostraron los explantos destinados a la crioconservación no se indica en la mayoría de los casos o es incompleta. No obstante, la presente investigación reveló que la recuperación del cultivo después de la crioconservación se vio significativamente afectada por el método de cultivo, la fase de crecimiento del cultivo y la interacción entre ambos factores.

En general, las tasas de recuperación del cultivo más elevadas se obtuvieron con explantos procedentes de cultivos en suspensión. Este resultado está de acuerdo con trabajos previos llevados a cabo en cultivos embriogénicos de aguacate (Guzmán-García 2012) y mango (Wu *et al.* 2007) en los que se obtuvieron mejores resultados con explantos cultivados en medio líquido en comparación con otros tomados de medio sólido.

El método de cultivo provocó importantes diferencias en la cinética de crecimiento de los cultivos de olivo. Los datos de incremento de peso fresco relativo mostraron que el crecimiento tuvo lugar de forma más rápida en medio líquido, alcanzando antes las distintas fases de crecimiento. En cultivos de células desdiferenciadas, Heine-Dobbernack *et al.* (2008) también describieron diferencias relacionadas con el método de cultivo, con un crecimiento más rápido en medio líquido que en medio sólido y, lo que es más importante, con una composición más homogénea. Este aspecto puede ser relevante ya que la sincronización del cultivo, o lo que es lo mismo, un alto grado de homogeneidad celular, ha sido considerado un factor importante que influye en el éxito de la crioconservación (Wu *et al.* 2007; Heine-Dobbernack *et al.* 2008). De hecho, se ha propuesto como una de las posibles razones por las que las suspensiones dan, en general, mejor resultado en este tipo de experimentos (Heine-Dobbernack *et al.* 2008).

Se han realizado numerosas investigaciones para determinar la fase de crecimiento óptima para la crioconservación. Clásicamente, las fases lag y exponencial temprana han sido consideradas las más idóneas para la crioconservación (Withers y Street, 1977) y así se ha sido determinado en distintas especies, como mijo (Lu y Sun 1992), *Taxus* (Kim *et al.* 2001) y tabaco (Reinoud *et al.* 1995). Sin embargo, en mango (Wu *et al.* 2007), zanahoria (Thierry *et al.* 1997), arroz (Sala *et al.* 1979) y *Papaver* (Friesen *et al.* 1991), los mejores resultados se consiguieron en las fases exponencial o exponencial media; en cultivos celulares de *Bromus inermis* se alcanzaron en las fases exponencial tardía o estacionaria temprana (Ishikawa *et al.* 2006) y en *Picea abies* y *Picea sitchensis* se registraron en la fase estacionaria (Find *et al.* 1998).

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente investigación, la fase de crecimiento óptima para la crioconservación de ES de olivo varía dependiendo del método de cultivo: mientras que en medio sólido los mejores resultados se obtuvieron con explantos en la fase lag (7 días), en medio líquido se registraron en la fase exponencial (28 días). Resultados similares se obtuvieron en cultivos embriogénicos de aguacate, aunque en esta especie las fases de crecimiento óptimas fueron diferentes en cada caso (Guzmán-García 2012). De

acuerdo con Ishikawa *et al.* (2006), estos resultados ponen de manifiesto un efecto evidente de las condiciones de cultivo y el genotipo sobre la respuesta a la crioconservación, y la fase de crecimiento óptima debe ser determinada en cada caso.

La morfología y el estado fisiológico de las células cultivadas han sido descritos como factores importantes que determinan la tolerancia a la crioconservación (Withers y Street 1977; Find *et al.* 1998) y modificaciones de estos factores dependiendo del método de cultivo o de la fase de crecimiento podrían explicar la respuesta diferencial observada en ES de olivo. Se ha descrito que solo las células pequeñas y densas (ricas en citoplasma y poco vacuoladas) sobreviven a la crioconservación, mientras que las células grandes y vacuoladas son muy propensas al daño por congelación (Find *et al.* 1998). Así, el análisis histológico de cultivos de mango en la fase óptima de crecimiento para la crioconservación revelaron que las células presentaban características específicas tales como un citoplasma denso, grandes cantidades de productos de reserva y crecimiento sincronizado (Wu *et al.* 2007). Sin embargo, Ishikawa *et al.* (2006) encontraron que las células de *Bromus inermis* en la fase óptima de crecimiento se caracterizaban por un alto contenido hídrico y una alta osmolaridad celular. De acuerdo con estos autores, las células más tolerantes fueron las de mayor tamaño, más vacuoladas y con alto contenido osmótico mientras que células menores en talla o menos vacuoladas y con bajo contenido osmótico fueron muy sensibles a la congelación. También se han descrito variaciones en el estado fisiológico celular dependiendo del estadio de crecimiento de los cultivos (Heine-Dobbernack *et al.* 2008).

#### III.4.4. Efecto de la crioconservación sobre la embriogénesis somática y aplicabilidad a distintas líneas embriogénicas

El tejido obtenido después de la crioconservación de ES de olivo presentó características embriogénicas en todos los casos. 4,5 meses después de la descongelación los cultivos establecidos a partir de explantos crioconservados presentaron tasas de crecimiento más elevadas que los cultivos control, no congelados. Estos resultados contrastan con los obtenidos en aguacate donde la proliferación de los cultivos disminuyó después de la crioconservación (Guzmán-García 2012). No obstante, tal y como señalaron Salaj *et al.* (2011), un efecto negativo de la crioconservación sobre el crecimiento de los cultivos puede ser debido a que no haya transcurrido el tiempo suficiente para la recuperación de los mismos. De acuerdo con estos autores, algunas líneas celulares necesitan un largo periodo de tiempo para alcanzar tasas de crecimiento similares a las de los tejidos no crioconservados.

El patrón de proliferación de los cultivos no se vio afectado por la crioconservación, manteniéndose una composición estructural similar, salvo en la línea T1 en la que aumentó significativamente la producción de ESTr  $\geq 5$  mm. La calidad de los ES no se vio alterada por el tratamiento con las soluciones crioprotectoras y la congelación.

En el presente trabajo, la crioconservación no afectó al potencial morfogénico de las líneas testadas, no modificando el número de ES formados durante la fase de desarrollo. Estudios previos han demostrado que la crioconservación no tiene un efecto negativo sobre el potencial embriogénico de los cultivos (Marum *et al.* 2004; Lardet *et al.* 2007). De hecho, en *Citrus deliciosa* (Aguilar *et al.* 1993), *Vitis vinifera* (Wang *et al.* 2002b), *Cyclamen persicum* (Winkelmann *et al.* 2004) y *Gentiana cruciata* (Mikula *et al.* 2011) se observó un aumento de la capacidad morfogénica después de la crioconservación, regenerando los cultivos crioconservados más ES en medio de maduración que los cultivos no congelados. No obstante, en *Quercus robur* (Martinez *et al.* 2003) y *Pinus pinaster* (Marum *et al.* 2004) la producción de embriones maduros fue menor en cultivos establecidos a partir de explantos crioconservados.

El efecto de la crioconservación sobre la germinación de ES varió dependiendo de la línea. Mientras en una de las líneas testadas se observó un aumento de la germinación, en las otras dos no se apreciaron diferencias significativas.

En esta fase de la embriogénesis somática se han descrito efectos distintos de la crioconservación dependiendo de la especie. En *Quercus suber*, las tasas de germinación de los embriones obtenidos a partir de cultivos congelados no fueron distintas de las de aquellos procedentes de material no congelado (Valladares *et al.* 2004). Sin embargo, en *Vitis vinífera* se observó un aumento de la germinación (Wang *et al.* 2002b) y en coco una disminución de la misma (Fang *et al.* 2004).

En ES de olivo no se ha observado una variación del potencial de regeneración después de la crioconservación, obteniéndose plantas a partir de los cultivos crioconservados de forma similar a los control. Sin embargo, en algunos casos, como *Festuca arundinacea* (Wang *et al.* 1994), *Quercus suber* (Valladares *et al.* 2004) o *Hevea brasiliensis* (Engelmann *et al.* 1997) se ha descrito un aumento de la tasa de regeneración en cultivos crioconservados. Las altas tasas de regeneración registradas en cultivos crioconservados en comparación con cultivos no crioconservados es probable que se deban a una selección preferencial de las células embriogénicas durante la congelación mientras que los tejidos no embriogénicos son destruidos durante el proceso (Mathur *et al.* 2003; Winkelmann *et al.* 2004). Esta selección podría estar relacionada con el hecho de que las células embriogénicas poseen un citoplasma denso y contienen menos agua (Häggmann *et al.* 1998; Mikula *et al.* 2005), características que las hacen más adecuadas para sobrevivir a la congelación. Valladares *et al.* (2004) también apuntaron que el aumento de la productividad inducida por la crioconservación puede probablemente ser debido al estrés sufrido por los embriones crioconservados durante los procesos de deshidratación en PVS2, exposición al NL y descongelación, lo que resulta en una destrucción preferencial de las células no embriogénicas y una selección de las embriogénicas.

En *Hevea brasiliensis*, Lardet *et al.* (2007) describieron una posible pérdida transitoria de la competencia para la regeneración después de la congelación en algunos stocks de callo crioconservado. Estos autores sugirieron que varios subcultivos en medio de mantenimiento después de la descongelación, pueden ser un prerrequisito para que las líneas recuperen su potencial de regeneración.

El objetivo de cualquier método de crioconservación es su aplicabilidad a un número elevado de genotipos. Los valores de recuperación del cultivo obtenidos con el protocolo de vitrificación en gota estándar oscilaron entre el 0-60%, dependiendo de la línea embriogénica. A pesar de que en varias líneas las tasas de recuperación del cultivo fueron inferiores al 20%, en todos los casos, excepto en la línea T3, fue posible el establecimiento de stocks a partir de ES congelados, ya que la proliferación celular no se vio limitada por la congelación.

En otras especies también se ha comprobado la aplicabilidad de diferentes métodos de crioconservación en un rango amplio de genotipos. Así, Panis *et al.* (2002) aplicaron un método simple de crioconservación que incluía un precultivo de 2 semanas en medio con 0,4 M de sacarosa a 36 accesiones de banana pertenecientes a 8 grupos genómicos diferentes. Las frecuencias de regeneración obtenidas, que oscilaron entre un 0 y un 66%, fueron altamente dependientes de la constitución genómica del cultivar. Nørgaard *et al.* (1993) también encontraron una gran variación genotípica en la tolerancia a la crioconservación de 70 cultivos embriogénicos de *Picea abies*, con algunos genotipos que mostraron un crecimiento rápido mientras que otros no sobrevivieron después de la descongelación. En *Picea abies* también se observaron diferencias entre tres genotipos, presentando uno de ellos una respuesta significativamente peor que el resto (Duran 1991).

Los resultados obtenidos con el método de vitrificación en gota estándar hacen aconsejable una optimización del mismo, con el fin de aumentar las tasas de recuperación de los cultivos obtenidas en algunas líneas y, lo que es más importante, evitar la existencia de resultados nulos. Tradicionalmente, para mejorar la respuesta de los explantos a la congelación, se han utilizado diferentes tratamientos de preacondicionamiento.

#### III.4.5. Efecto de un precultivo a corto plazo con distintas concentraciones de sacarosa en medio sólido y líquido

Un procedimiento de crioconservación exitoso normalmente incluye una fase de precultivo antes del tratamiento con soluciones crioprotectoras (Ford *et al.* 2000). La inclusión de esta fase es común en muchos protocolos de crioconservación y refleja la necesidad de mejorar la tolerancia a la desecación y al enfriamiento del germoplasma que va a ser almacenado (Benson 1999).

Los pretratamientos para la crioconservación de células embriogénicas normalmente se llevan a cabo con azúcares, tales como sacarosa, maltosa y glucosa, o azúcares alcohol, como sorbitol y manitol (Dumet *et al.* 1994). No obstante, la sacarosa es el compuesto más utilizado, habiéndose demostrado su superioridad frente a otros azúcares para inducir tolerancia a la crioconservación (Dumet *et al.* 1994).

La sacarosa se ha utilizado para mejorar la crioconservación de cultivos embriogénicos de una variedad de especies, como *Pinus caribea* (Laine *et al.* 1992), pino marítimo (Marum *et al.* 2004), *Pinus nigra* (Salaj *et al.* 2007), *Picea omorica* (Hazubzca-Przybyl *et al.* 2010), *Abies nordmanniana* (Misson *et al.* 2006) o *Picea sitchensis* (Gale *et al.* 2007). También se ha aplicado un pretratamiento con sacarosa para mejorar la respuesta a la crioconservación de especies tropicales (Tsai *et al.* 2009) y en ES de alfalfa y zanahoria un precultivo de este tipo ha dado lugar a un aumento de la tolerancia a la desecación (Lecouteux *et al.* 1992). En ES de coco el precultivo con sacarosa también mejoró la tolerancia a la desecación y a la crioconservación (Fang *et al.* 2004).

En ES de olivo, un precultivo a corto plazo con sacarosa provocó una mejora en la respuesta de los ES a la crioconservación, además de un adelanto de la misma. El tratamiento óptimo dependió del método de cultivo: mientras que en medio sólido los mejores resultados se obtuvieron después de 7 días en medio con 0,2 M de sacarosa, en medio líquido se consiguieron después de 1 día en medio con 0,4 M de sacarosa.

Trabajos previos ya habían puesto de manifiesto la influencia de un tratamiento con sacarosa sobre la crioconservación de ES de esta especie. Así, Shibli y El-Juboory (2000) obtuvieron un 68% de recrecimiento después de la crioconservación mediante encapsulación-vitrificación de ES del cultivar 'Nabali' pretratados con 0,75 M de sacarosa. Aplicando un precultivo con la misma concentración de este azúcar Lynch *et al.* (2011) consiguieron un 38% de recrecimiento en ES del cultivar 'Canino' crioconservados con un método de congelación lenta.

En otras especies como patata y rosa fue suficiente un precultivo durante 48 h en medio líquido con 0,5 M sacarosa (Halmagyi *et al.* 2005; Halmagyi y Pinker 2006), mientras que en fresa los mejores resultados se obtuvieron con 24 h en 0,25 M sacarosa (Pinker *et al.* 2009). Por el contrario, en aguacate, el tratamiento en medio sólido con 0,3 M sacarosa durante 3, 7, 14 ó 21 días no tuvo una influencia significativa sobre la supervivencia de los cultivos embriogénicos después de la crioconservación, aunque aumentó la capacidad proliferativa de las muestras crioconservadas (Guzmán-García 2012).



La sacarosa juega un papel importante en la aclimatación de las plantas al frío y en la tolerancia a la congelación (Pinker *et al.* 2009). No obstante, no se conoce completamente su modo de acción (Panis *et al.* 1996). Tal y como se ha indicado anteriormente, los efectos de un pretratamiento con altas concentraciones de sacarosa pueden tener lugar a niveles muy distintos. La sacarosa provoca una reducción lenta del contenido hídrico celular por ósmosis que, junto con la absorción de la misma, conduce a una solución protoplásmica más concentrada (Panis *et al.* 2005). Como consecuencia, disminuyen el punto de congelación y la cantidad de agua congelable presente en los tejidos (Panis *et al.* 1996). Además, este aumento de la viscosidad celular ayuda a conseguir la vitrificación (Dereuddre *et al.* 1991; González-Arno y Moreira 1996). La acumulación de sacarosa en los tejidos también ayuda a mantener viables las células durante la deshidratación y la crioconservación mediante la estabilización de las membranas (Crowe *et al.* 1984; Niu *et al.* 1997; Oliver *et al.* 1998). De hecho, después de un precultivo en un medio enriquecido con sacarosa se ha observado la aparición de alteraciones a nivel de membranas (Jitsuyama *et al.* 2002; Helliott *et al.* 2003). Este efecto se debe a la capacidad de la sacarosa para formar puentes de hidrógeno con las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana, reemplazando así las moléculas de agua que se unen a estos compuestos en el estado hidratado (Crowe *et al.* 1984). También se le ha atribuido un papel en la estabilización de proteínas en condiciones de congelación (Kendall *et al.* 1993). Asimismo, puede provocar una serie de cambios que incluyen alteraciones en los ácidos grasos de membrana, esteroides y aminoácidos así como modificaciones en el patrón de proteínas (Jitsuyama *et al.* 2002). Finalmente, durante el precultivo con azúcares, los tejidos se someten a un estrés osmótico suave que puede inducir cambios metabólicos que dan lugar a un aumento de la tolerancia a la desecación, tales como el aumento de los niveles de ABA y de proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA) (Charoensub *et al.* 1999; Reinhoud *et al.* 2000). La acumulación de estos compuestos puede inducir tolerancia frente a un estrés hídrico posterior (Touchell *et al.* 2002).

Según Panis *et al.* (1996), los efectos crioprotectores de la sacarosa residen en una aclimatación a la deshidratación, más que al proceso de congelación en sí. En cultivos embriogénicos de olivo, Sánchez-Romero *et al.* (2009) apuntaron que la sacarosa ayudaba a superar los efectos negativos de la incubación en soluciones crioprotectoras. Sin embargo, los resultados obtenidos en ES de esta especie no han puesto de manifiesto este tipo de respuesta.

La concentración de sacarosa en el medio de precultivo puede determinar el éxito de la crioconservación (Fang *et al.* 2004). Una deshidratación excesivamente fuerte con sacarosa puede causar la muerte de la célula por choque osmótico o plasmolisis no reversible, tal y como se ha descrito en vainilla (Wilkinson *et al.* 2003; González-Arno *et al.* 2010). Sin embargo, diferentes autores (Halmagyi *et al.* 2004; Winkelmann *et al.* 2004; Halmagyi y Pinker 2006) han demostrado un efecto positivo de tratamientos con altas concentraciones de sacarosa (0,5-0,7 M) durante periodos cortos de tiempo (24-48 h) sobre la capacidad de regeneración de ápices de crisantemo y rosa y de PEMs de ciclamen.

#### **III.4.6. Efecto de un precultivo a largo plazo en medio sólido con distintas concentraciones de sacarosa**

El precultivo con sacarosa durante periodos breves de tiempo puede no ser suficiente para desencadenar cambios metabólicos asociados con la tolerancia a la crioconservación (Touchell *et al.* 2002; Fang *et al.* 2004), tal y como se ha descrito en ES de zanahoria (Tessereau *et al.* 1994). Sin embargo, tratamientos prolongados pueden provocar un estrés osmótico elevado, causando daños en los tejidos (Panis *et al.* 1996). En *Theobroma cacao* se

ha puesto de manifiesto que el uso inadecuado de este tipo de precultivos puede tener efectos perjudiciales sobre la viabilidad de los ES (Fang *et al.* 2004). Otras especies como *Poncirus trifoliata* también mostraron una alta sensibilidad a la sacarosa (Gonzalez-Arno *et al.* 1998).

Una forma de evitar los efectos tóxicos de este tipo de tratamientos es realizar una exposición progresiva de los explantos a concentraciones elevadas de azúcar, en vez de una exposición directa a dosis altas (Bhatti *et al.* 1997; Find *et al.* 1998; Chmielarz *et al.* 2005).

El cultivo a largo plazo de ES de olivo en medio sólido con altas concentraciones de sacarosa empeoró el aspecto de los tejidos. No obstante, a pesar de este cambio de apariencia, el precultivo durante 42 días en medio sólido con 0,2 M sacarosa mejoró de forma significativa la respuesta de los ES a la crioconservación, con un aumento de la tasa de recuperación del cultivo del 20 al 80%.

De acuerdo con Sánchez-Romero *et al.* (2009), el tratamiento a largo plazo con sacarosa puede tener un doble efecto: ayudar a superar la toxicidad de la solución PVS2 e inducir resistencia a la deshidratación celular.

#### **III.4.7. Efecto de un precultivo a largo plazo en medio líquido con distintas concentraciones de sacarosa**

El precultivo de los embriones durante 28 días en medio líquido con 0,2 M de sacarosa mejoró la tasa de recuperación del cultivo después de la descongelación, con un aumento del 40 al 90%, lo que pone de manifiesto su eficiencia en la inducción de tolerancia a la crioconservación. Sin embargo, la calidad de los ES empeoró después de un precultivo prolongado en medio con 0,4 M sacarosa. De hecho, el 20% de los cultivos murió como consecuencia de este tratamiento y ningún explanto sobrevivió a la congelación. Este precultivo parece, por lo tanto, demasiado agresivo para los ES de olivo. Tal y como pone de manifiesto la comparación de los resultados obtenidos en medio sólido y líquido, el tratamiento prolongado con 0,4 M de sacarosa provoca daños más acusados cuando la incubación se realiza en medio líquido, a pesar de la menor duración del tratamiento en este caso.

Gonzalez-Arno *et al.* (1998) describieron en *Poncirus trifoliata* una alta sensibilidad al cultivo con sacarosa en medio líquido. Sin embargo, Wang *et al.* (2002a) apuntaron una alta tolerancia de esta especie a este tipo de tratamientos.

Basándose en los resultados obtenidos en los distintos tipos de precultivos con sacarosa testados, se puede concluir que, en ES de olivo, 7 días en medio sólido con 0,2 M de sacarosa parece ser el tratamiento óptimo antes de la congelación en NL, mejorando de forma significativa la eficiencia del proceso.

#### **III.4.8. Influencia de la crioconservación y de un pretratamiento con sacarosa sobre la embriogénesis somática y aplicabilidad del método a distintas líneas embriogénicas**

En olivo, la congelación en NL después de un precultivo de 7 días en medio sólido con 0,2 M de sacarosa mejoró la proliferación de los cultivos embriogénicos. En *Vitis vinifera*, sin embargo, Wang *et al.* (2002b) no observaron diferencias en el patrón de crecimiento de los cultivos establecidos después de la crioconservación tras un precultivo con sacarosa.

Aunque estudios previos llevados a cabo en olivo pusieron de manifiesto un aumento del potencial morfogénico como consecuencia de la crioconservación (Benelli *et al.* 2001), los resultados obtenidos en la presente investigación no revelaron diferencias debidas a este proceso, ni en la fase de mantenimiento ni en la de desarrollo de ES. No obstante, en ambos

casos se apreció un aumento de la producción de embriones en estadios avanzados de desarrollo.

En células embriogénicas de *Gentiana cruciata* congeladas después de un tratamiento con altas concentraciones de sacarosa se observó un importante incremento de la producción de ES (Mikula *et al.* 2011). En *Vitis vinifera* también se ha descrito un aumento del potencial de regeneración en células pretratadas con sacarosa y crioconservadas (Wang *et al.* 2002b). Además, la regeneración tuvo lugar más rápidamente, obteniéndose más embriones de distintos estadios de desarrollo.

No obstante, de acuerdo con Danso y Ford-Lloyd (2004), concentraciones elevadas de sacarosa pueden tener efectos adversos sobre la morfogénesis. Concentraciones de sacarosa superiores a 0,3 M disminuyeron de forma significativa el potencial embriogénico de cultivos de Cassava, probablemente debido a una deshidratación severa de los tejidos. Sin embargo, existen evidencias de que altas concentraciones de sacarosa pueden provocar la formación directa del embrión.

La tasa de germinación de los ES de olivo no se vio afectada por el tratamiento con sacarosa ni por la congelación aunque en cultivos embriogénicos de *Vitis vinifera* se obtuvieron tasas de germinación más elevadas en los embriones obtenidos de cultivos congelados después de un pretratamiento con sacarosa (Wang *et al.* 2002b).

No obstante, la crioconservación de ES de olivo después de un precultivo durante 7 días con 0,2 M de sacarosa tuvo un efecto positivo sobre el proceso de embriogénesis somática, aumentando el potencial de regeneración debido a un efecto acumulado de los dos procesos: el precultivo con sacarosa y la congelación en NL. Las plántulas obtenidas presentaron buena calidad, respondiendo a las fases posteriores de multiplicación, enraizamiento y aclimatación de forma similar a las regeneradas a partir de cultivos control no crioconservados. Una mejoría de la embriogénesis somática después de la crioconservación tras un precultivo con sacarosa ha sido también descrita en cultivos de vid (Wang *et al.* 2002b).

En lo que se refiere a la aplicabilidad del método, el precultivo con alta concentración de sacarosa mejoró de forma importante la respuesta a la crioconservación de todos los genotipos testados, aunque de forma variable dependiendo de la línea.

El efecto del genotipo ha sido también estudiado en otras especies, como el coco, donde se obtuvieron tasas de supervivencia significativamente diferentes en distintos genotipos crioconservados después de un tratamiento con sacarosa (Fang *et al.* (2004). Probando diferentes concentraciones de sacarosa (0,5, 0,75 y 1,0 M) estos autores encontraron genotipos cuya recuperación era significativamente mayor que la de otros, para cualquiera de las concentraciones testadas.

Estudios llevados a cabo en distintos clones de palma de aceite mostraron que la deshidratación daba lugar a un nivel hídrico similar en todos los clones. Sin embargo, las tasas de supervivencia óptimas después de la congelación en NL se obtenían con periodos de deshidratación diferentes (Dumet *et al.* 1992; Dumet *et al.* 1993b). Esto puede ser debido a diferencias fisiológicas entre los clones, los cuales pueden absorber la sacarosa de manera diferente durante el precultivo, dando lugar a cantidades de agua cristalizable distintas (Dumet *et al.* 1993a).

En algunos casos, tasas bajas de supervivencia obtenidas después de un precultivo con sacarosa han sido atribuidas a una adquisición insuficiente de tolerancia a la deshidratación o la crioprotección (Turner *et al.* 2001b), debido probablemente a una exposición insuficiente (Fang *et al.* 2004). No obstante, en ES de olivo, el tratamiento durante 7 días con 0,2 M de sacarosa no pareció afectar a la tolerancia de los explantos a las soluciones crioprotectoras utilizadas en



el método de vitrificación en gota, llevando a cabo su efecto a través de otro/s mecanismo/s.

El protocolo de vitrificación en gota aplicado tras un precultivo de 7 días en medio con 0,2 M de sacarosa ha resultado eficiente para todos los genotipos testados, superando el 40% de recuperación del cultivo recomendado por Reed (2001), salvo en la línea T3 en la que solo se obtuvo una recuperación del 10%. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de llevar a cabo estudios adicionales hasta alcanzar en esta línea niveles de recuperación más elevados.



## **IV. ESTABILIDAD GENÉTICA**



## IV.1. Introducción

El crecimiento *in vitro* de células vegetales y su regeneración en plantas es un proceso asexual. Esto implica que solo tienen lugar divisiones mitóticas y, teóricamente, no debería aparecer durante el proceso ningún tipo de variación. Idealmente, lo que se espera es la multiplicación clonal de plantas genéticamente uniformes (Larkin 1998). Sin embargo, durante el proceso de cultivo puede tener lugar un fenómeno no esperado y normalmente no deseado: la aparición de variación espontánea, no controlada y aleatoria (Karp 1994).

Se entiende como variación somaclonal los cambios que se producen en células y tejidos cultivados *in vitro* (Larkin y Scowcroft 1981). La variación somaclonal es espontánea y los cambios pueden ser heredables o no (Kaepler *et al.* 2000).

Desde la primera observación de la variación somaclonal por Braun (1959), este es uno de los principales problemas del cultivo *in vitro*, ya que puede dar lugar a la producción indeseable de plantas fuera de tipo (Karp 1993; Cassells *et al.* 1999).

Sin embargo, la variación somaclonal puede resultar útil en los programas de mejora genética de plantas (Bouharmont 1994; Mehta y Angra 2000; Predieri 2001), ya que constituye una importante fuente de variabilidad genética. Así, en un gran número de especies se han descrito casos de variación somaclonal para distintos caracteres agronómicos tales como resistencia a enfermedades, altura de la planta, número de ramas, maduración y otros rasgos fisiológicos y bioquímicos (Brar y Jain 1998). En algunos casos, los variantes somaclonales han resultado útiles desde un punto de vista agronómico y se han convertido en nuevos cultivares (Brar y Jain 1998).

### IV.1.1. Factores que inducen variación somaclonal

El cultivo de tejidos actúa por sí mismo como un sistema mutagénico porque, desde su aislamiento, las células son sometidas a experiencias traumáticas y pueden reprogramarse (Jain 2001). La aparición de variación somaclonal parece verse afectada por diversos factores tales como el tipo de explanto, el genotipo, el medio de cultivo o la edad de la planta madre (Jain 1997; Veilleux y Johnson 1998). Dependiendo del tipo de planta, el número de subcultivos es otro aspecto importante que puede aumentar la frecuencia de variación (Jain 2001).

#### IV.1.1.1. Tipo de explanto

El nivel de organización y diferenciación del explanto de partida es un factor clave en la aparición de variación somaclonal. El uso de tejidos meristemáticos, como el periciclo o el procambium, reduce las posibilidades de variación (Sahijram *et al.* 2003). Por el contrario, los tejidos altamente diferenciados, como las raíces, hojas o tallos, generalmente producen más variantes somaclonales, probablemente debido a la fase de callo por la que pasa el cultivo, tanto cuando la regeneración tiene lugar vía embriogénesis somática como mediante organogénesis adventicia (Sharma *et al.* 2007).

En muchos casos, las células embriogénicas se han mostrado altamente estables, no presentando variación somaclonal (Isabel *et al.* 1993). Jain *et al.* (1995) indicaron que las plantas regeneradas vía embriogénesis somática producen una progenie fiel al tipo con mínima variación. Sin embargo, puede aparecer variación somaclonal en los cultivos embriogénicos estos si se mantienen en proliferación durante periodos prolongados de tiempo.

#### IV.1.1.2. Genotipo

Como se indicó anteriormente, el genotipo se considera uno de los factores implicados en la aparición de variación somaclonal (Brar y Jain 1998), independientemente del método de regeneración (Bebeli *et al.* 1988). Así, se han demostrado diferencias en la frecuencia de variación somaclonal tanto entre especies como entre genotipos de una misma especie (Bebeli *et al.* 1988).

Diferentes genomas responden de forma distinta al estrés causado por el cultivo *in vitro*. Las diferencias en la estabilidad genética están relacionadas con diferencias en la dotación genética del explanto, ya que algunos componentes del genoma lo hacen más inestable durante el proceso de cultivo.

La variación somaclonal que da lugar a cambios en el número de cromosomas y a reordenamientos cromosómicos es más fácil de recuperar en regenerantes de poliploides que de diploides o haploides, ya que los poliploides pueden tolerar alteraciones genómicas más importantes que los diploides o haploides. Sin embargo, las mutaciones génicas se expresan mejor en haploides y diploides (Brar y Jain 1998).

Los genotipos con elementos transposones son más inestables en cultivo que los que no los tienen (Peschke y Phillips 1991), aunque no todos los cambios se deben al movimiento de trasposones (William *et al.* 1991).

#### IV.1.1.3. Medio de cultivo

El medio y las condiciones de cultivo pueden provocar alteraciones en las células y tejidos cultivados dando lugar a cambios genéticos en las plantas obtenidas (Rani y Raina 2000; Jain 2001). Los reguladores de crecimiento presentes en el medio de cultivo pueden actuar como agentes mutagénicos (Brar y Jain 1998) ya que actúan sobre la división celular, el grado de crecimiento desorganizado y la proliferación selectiva de células específicas (Gould 1984). El tipo y la concentración de hormonas, especialmente las auxinas, tienen un efecto sobre la metilación de parte del genoma (Neelakandan *et al.* 2012) y se han asociado a la inestabilidad genética en plantas (Karp 1989; Cullis 1992). Otros componentes del medio de cultivo, como la fuente de nitrógeno, también provocan metilación del ADN (Leljak-Levanic *et al.* 2004). Algunos antibióticos, como la cefotaxima, kanamicina e higromicina, contribuyen a promover la metilación irreversible de secuencias repetitivas (Neelakandan *et al.* 2012).

#### IV.1.1.4. Tiempo de cultivo

En general, la frecuencia de la variación somaclonal aumenta con el tiempo de cultivo y el número de subcultivos, especialmente en suspensiones celulares y cultivos de callos (Reuveni y Israeli 1990; Rodrigues *et al.* 1998; Bairu *et al.* 2006). Rodrigues *et al.* (1998) demostraron la aparición de variantes somaclonales a partir del quinto subcultivo (1,3%) y un aumento de los mismos después de 11 subcultivos (3,8%).

La multiplicación rápida de los tejidos puede afectar a su estabilidad genética, pudiendo provocar la aparición de variación somaclonal (Israeli *et al.* 1995). Para comprender mejor este problema así como la evolución de la tasa de variación en el cultivo de tejidos, Côte *et al.* (2001) propusieron un modelo estadístico para predecir la velocidad teórica de mutación con el número de ciclos de multiplicación como parámetro principal. Dos conclusiones principales derivaron de este modelo: 1) que se puede esperar un aumento de la tasa de variación como función exponencial del número de ciclos de multiplicación y 2) que después de un número

determinado de ciclos de multiplicación, se pueden esperar porcentajes variables de individuos fuera de tipo. Aunque una aproximación estadística es útil para una mejor comprensión de hechos experimentales observados frecuentemente en el cultivo de tejidos, como reconocieron los autores, el modelo tenía una aplicación limitada debido a la complejidad de los sistemas biológicos.

Hirochika *et al.* (1996) apuntaron que algunos retroposones se activan con el tiempo de cultivo, de manera que las plantas regeneradas mostraron un aumento en el número de copias de retroposones.

#### IV.1.2. Mecanismos de la variación somaclonal

Es deseable comprender la base molecular de la variación somaclonal para intentar evitarla o utilizarla como fuente de variabilidad genética cuando se desee. La variación somaclonal puede ser de dos tipos:

- a. Variación genética, en la que los cambios producidos son transmisibles genéticamente.
- b. Variación epigenética, que teóricamente no es heredable. No obstante, en los últimos años se ha demostrado la transmisión a la descendencia de cambios en la metilación del ADN y su mantenimiento durante generaciones.

Los mecanismos por los que aparece la variación somaclonal son poco conocidos aunque diferentes procesos parecen estar implicados en la aparición de los mismos (Vázquez 2001).

##### IV.1.2.1. Mutaciones cromosómicas

Una mutación es cualquier cambio heredable en el material genético que no sea consecuencia de la recombinación. Cuando la mutación afecta a grandes regiones cromosómicas se denomina mutación cromosómica mientras que si cambia la secuencia nucleotídica de un solo gen, se denomina mutación génica (Figueiras Merino 2012). Las mutaciones cromosómicas pueden agruparse en tres categorías básicas: reordenamientos cromosómicos, aneuploidías y poliploidías. Los reordenamientos cromosómicos son mutaciones que cambian la estructura de cromosomas individuales. Se dan cuatro tipos básicos de reordenamiento cromosómico, duplicación, delección, inversión y translocación, que incluyen cambios en los que se eliminan, añaden o reordenan partes sustanciales de uno o más cromosomas. En la aneuploidía se altera el número de cromosomas de manera que se agregan o eliminan uno o más cromosomas individuales. En la poliploidía se agregan uno o más juegos completos de cromosomas dando lugar a individuos con más de dos juegos de cromosomas ( $3n$ ,  $4n$ ,  $5n$  o más) (Pierce 2013).

Los cambios en la estructura del cromosoma pueden afectar a la expresión y transmisión de genes específicos por delección de una copia de un gen o por conversión del gen durante los procesos de reparación. La recombinación, o rotura de genes, puede ocurrir en regiones preferentes o puntos calientes de cromosomas específicos (Brar y Jain 1998). Este tipo de modificaciones afectan al gen en el que tiene lugar la rotura pero, si tiene lugar una traslocación a un lugar diferente, también se pueden alterar las funciones de genes distantes. Además, genes en los que la transcripción puede estar regulada de forma coordinada, también pueden verse afectados. Lee y Philips (1988) consideran dos razones principales para la elevada frecuencia de estos cambios: la replicación tardía de la heterocromatina y los desequilibrios en nucleótidos como consecuencia de la composición del medio de cultivo.

En las células cultivadas y en los somaclones regenerados a partir de las mismas se han

encontrado variaciones tanto en el número como en la estructura de los cromosomas. (D'Amato 1985; Lee y Phillips 1988; Fourré *et al.* 1997; Al-Zahim *et al.* 1999; Hao y Deng 2002; Mujib *et al.* 2007). De hecho, estas constituyen las formas predominantes de cambio en las células y tejidos cultivados *in vitro*, con numerosos ejemplos de reordenamientos cromosómicos, como translocaciones, inversiones, deleciones y duplicaciones, aneuploidías y cambios en el nivel de ploidía (Lee y Phillips 1988; Duncan 1997).

#### IV.1.2.2. Mutaciones génicas

Una mutación génica se define como una alteración en la secuencia del ADN de un gen, por lo que incluye tanto el cambio en un par de bases (mutación puntual o sustitución) como la adición o delección de uno o más pares de bases (Figueiras Merino 2012).

Este tipo de variación es el menos descrito en el cultivo *in vitro*. No obstante, se han encontrado diferentes variantes somaclonales causados por mutaciones génicas. Así, en 230 plantas de tomate regeneradas a partir de callo procedente de hojas, Evans y Sharp (1983) encontraron 13 mutaciones génicas. Dichas mutaciones fueron debidamente caracterizadas y asociadas a loci específicos (Evans y Sharp 1983; Evans y Bravo 1986; Evans y Sharp 1986). También se han descrito somaclones con mutaciones en un solo gen recesivo en arroz (Fukui 1983; Sun *et al.* 1983), tabaco (Prat 1983) y maíz (Edallo *et al.* 1981). En trébol rojo, la variación se debió a los efectos aditivos de genes mutados (Keyes *et al.* 1980). En maíz también se han descrito mutaciones génicas relacionadas con características de la semilla y de las estructuras reproductivas, además de con la deficiencia en clorofila, enanismo y necrosis en las hojas (Phillips *et al.* 1994). En variantes somaclonales procedentes de cultivos de anteras de patata, Valkonen *et al.* (1999) identificaron un gen recesivo de enanismo.

#### IV.1.2.3. Sobrecruzamiento somático

El sobrecruzamiento somático, o recombinación mitótica, es un tipo de recombinación genética que puede ocurrir durante la mitosis de células somáticas. Este tipo de recombinación puede causar la expresión de genes recesivos en individuos heterocigóticos. Esta situación suele ser muy poco frecuente ya que los cromosomas homólogos no están apareados en las células somáticas y, por lo tanto, es realmente difícil que haya sobrecruzamiento entre ellos (Benito y Espino 2012). No obstante, factores ambientales y ciertos agentes incrementan su frecuencia (Brar y Jain 1998). De hecho, se han recuperado mutantes homocigóticos recesivos en regenerantes primarios de varias especies tales como tomate, arroz, trigo, maíz y colza, y se ha propuesto el sobrecruzamiento somático como el posible mecanismo implicado (Evans y Sharp 1983; Larkin *et al.* 1984; Kaeppler y Phillips 1993a, b).

#### IV.1.2.4. Amplificación del ADN

Las evidencias disponibles indican que algunos genes se pueden amplificar durante la diferenciación o en respuesta a distintos tipos de estrés ambiental.

Se ha comprobado que el número de copias de secuencias específicas de ADN puede variar durante el cultivo de manera que esta amplificación o reducción de secuencias de ADN puede explicar, al menos en parte, la variación somaclonal (Brar y Jain 1998). Así, se han detectado amplificaciones en somaclones de alfalfa (Donn *et al.* 1984), triticale (Lapitan *et al.* 1988) y zanahoria (Armholdt-Schmitt *et al.* 1995). En *Plantago lagopus*, una amplificación masiva de ADNr 5S dio lugar a la formación de 'un cromosoma B' extra independiente (Kour *et*



*al.* 2009).

#### IV.1.2.5. Transposones

Los transposones o elementos genéticos transponibles son secuencias de ADN que tienen la capacidad de moverse de un lugar a otro del genoma (Benito y Espino 2012). La escisión y reinserción de tales elementos puede afectar la expresión de genes individuales. Además, la excisión de transposones puede generar reordenamientos de secuencias cromosómicas adyacentes (Peschke *et al.* 1987; Brar y Jain 1998).

La mayoría de los elementos transponibles están inactivos en condiciones de crecimiento y desarrollo normales pero pueden ser movilizados en condiciones específicas, como la irradiación (Nakazaki *et al.* 2003), presión hidrostática (Lin *et al.* 2006), infección por patógenos (Pouteau *et al.* 1994), heridas y congelación (Mhiri *et al.* 1997) o la introducción de ADN extraño (Liu y Wendel 2000). El cultivo repetitivo a largo plazo se ha comprobado que provoca la activación de elementos transponibles, dando lugar a la aparición de variación somaclonal (Hirochika *et al.* 1996). Hirochika *et al.* (1996) identificaron en arroz 15 familias de retrotransposones (*Tos6* - *Tos20*), que estaban inactivos, o casi inactivos, en condiciones normales de crecimiento. Tres de ellos (*Tos10*, *Tos17* y *Tos19*) se activaron en condiciones de cultivo *in vitro*.

#### IV.1.2.6. Variación epigenética

El término epigenética se refiere a cambios en la expresión génica que se producen sin que haya cambios en la secuencia del ADN (Benito y Espino 2012). Hay tres mecanismos epigenéticos principales: 1) modificación reversible del ADN mediante la adición o eliminación de grupos metilo, 2) modificación de las histonas mediante la adición o eliminación de grupos químicos y 3) regulación de la expresión génica mediante moléculas de ARN pequeño no codificante (Klug *et al.* 2013).

Los cambios epigenéticos son, en muchos casos, temporales y las plantas pueden volver a fenotipos normales con relativa facilidad. Sin embargo, algunos pueden perdurar durante bastante tiempo y pueden incluso ser transferidos durante la propagación sexual (Brettell y Dennis 1991). Esto último lleva a epimutaciones heredables (epialelos) (Jullien y Berger 2010). Johannes *et al.* (2009) detectaron cambios epigenéticos en *Arabidopsis thaliana* que fueron estables durante al menos ocho generaciones.

La metilación es un proceso que tiene lugar con frecuencia y puede constituir uno de los mecanismos fundamentales en la variación inducida por cultivo de tejidos (Phillips *et al.* 1990). La metilación (o desmetilación) implica la adición (o eliminación) posreplicativa de un grupo metilo a una base del ADN mediante reacciones catalizadas por enzimas metiltransferasas (o metilasas) (Benito y Espino 2012). Esta alteración puede conducir a la replicación tardía de la heterocromatina y por lo tanto a roturas cromosómicas y a cambios en la expresión génica (Brar y Jain 1998). Lambe *et al.* (1997) presentaron evidencias de la ocurrencia de alteraciones en los patrones de metilación del ADN durante el cultivo a largo plazo de callo.

De acuerdo con López *et al.* (2010), la frecuencia de las variaciones por metilación aumentó con la edad del cultivo, aunque algunos estudios también mostraron un posterior descenso en regenerantes de cultivos antiguos, posiblemente debido a la pérdida de la totipotencia y del potencial de regeneración en células altamente mutadas, como se observó en cultivos de cacao.

### IV.1.3. Técnicas de evaluación de la estabilidad genética

La variación somaclonal que puede ocurrir durante el cultivo *in vitro* de tejidos puede llegar a suponer un grave problema, especialmente en operaciones comerciales a largo plazo. La identificación precoz y eficiente de variantes somaclonales constituye por lo tanto una necesidad cuando se aplican protocolos en los que se utilizan técnicas de cultivo *in vitro*.

La estabilidad genética de las plantas obtenidas mediante cultivo *in vitro* debe ser evaluada lo antes posible para que los posibles efectos deletéreos, que pueden expresarse en etapas avanzadas del desarrollo, no tengan un impacto económico grave (Marum *et al.* 2009).

La fidelidad de las plantas procedentes del cultivo *in vitro* puede ser evaluada a distintos niveles: morfológico, bioquímico, citológico y molecular (Srivastava *et al.* 2009; Baránek *et al.* 2010; Konieczny *et al.* 2010; Mallón *et al.* 2010). No obstante, se recomienda el uso de una combinación de varias técnicas, ya que proporciona una evaluación más exacta (González-Benito *et al.* 1999).

#### IV.1.3.1. Análisis morfológico

Los variantes somaclonales pueden ser identificados utilizando caracteres morfológicos tales como la altura, morfología de la hoja, alteración de la pigmentación (Israeli *et al.* 1991), biomasa de la planta, rendimiento de la semilla y rendimiento agronómico (Earle y Gracen 1985; Zehr *et al.* 1987; Lee *et al.* 1988; Carver y Johnson 1989; Dahleen *et al.* 1991; Bregitzer *et al.* 1998). Cuando se evalúan estos parámetros se suele asumir que los cambios detectados son debidos a una variación genética inducida durante el cultivo *in vitro*. Sin embargo, la expresión de caracteres fenotípicos puede verse en muchos casos afectada por el estadio de desarrollo o por factores ambientales, pudiendo no reflejar la verdadera dotación genética de la planta (Cloutier y Landry 1994; Mandal *et al.* 2001).

La detección de variantes usando caracteres morfológicos es especialmente adecuada para plantas establecidas en campo o invernadero, aunque su aplicación comercial es difícil debido al elevado coste que representa (Israeli *et al.* 1995). La aplicación de la biometría puede ser útil para evaluar la variación de caracteres fenotípicos (Harding 1996; Harding y Staines 2001). La evaluación de la variación fenotípica puede llevarse a cabo utilizando listas específicas de descriptores (IBPGR 1977), analizando posteriormente los caracteres mediante análisis de componentes principales (Denton *et al.* 1977; Harding y Staines 2001).

En olivo, Leva (2009) evaluó la fidelidad morfológica en plantas micropropagadas a partir de yemas axilares y en plantas regeneradas vía embriogénesis somática. Las plantas micropropagadas mostraron una similitud fenotípica muy alta en comparación con las producidas por métodos de estaquillado convencionales. Las plantas somáticas exhibieron dos fenotipos variantes estables: BOS (*bush-olive somaclone*) y COS (*columnar-olive somaclone*). Una amplia variedad de caracteres estuvieron implicados de forma diferente en la variación somaclonal tales como la altura de la planta, las dimensiones de la copa, las hojas, las inflorescencias y los frutos. De acuerdo con Leva (2009), la estabilidad morfológica de las plantas de olivo obtenidas a partir del cultivo de tejidos estaba estrictamente relacionada con el método de propagación utilizado.

#### IV.1.3.2. Análisis citológico

La variación de la ploidía, el número o la estructura de los cromosomas constituye una evidencia directa de un posible cambio en la composición genética de un organismo (Kunitake

*et al.* 1995; Al-Zahim *et al.* 1999). En consecuencia, el análisis de los cromosomas es una forma importante de detección de la variación somaclonal y ha sido ampliamente utilizado (Bogdanova 2003; Nakano *et al.* 2006; Fiuk *et al.* 2010).

Existe una gran gama de técnicas citológicas para estimar la estabilidad cromosómica. La observación de aberraciones cromosómicas utilizando el microscopio óptico u otras técnicas microscópicas más complejas se ha usado con éxito en la detección de variación somaclonal en plantas procedentes de cultivo *in vitro* (Al-Zahim *et al.* 1999; Raimondi *et al.* 2001; Mujib *et al.* 2007). Sin embargo, requieren un consumo importante de tiempo y pueden resultar tediosas, especialmente cuando los cromosomas son difíciles de observar (Doležel 1997). Como consecuencia, en la actualidad se usa ampliamente la citometría de flujo (Doležel *et al.* 2004). Esta técnica implica la preparación de suspensiones acuosas de núcleos intactos cuyo ADN es teñido con un fluorocromo. Los núcleos se clasifican de acuerdo con sus intensidades de fluorescencia relativas o contenido de ADN (Pfosser *et al.* 1995; Doležel y Bartoš 2005). Está técnica es cómoda y rápida y ha sido utilizada para la evaluación de la ploidía en alcornoque (Loureiro *et al.* 2005), *Juniperus* (Loureiro *et al.* 2007), fresa (Nehra *et al.* 1992), banana (Giménez *et al.* 2001) y patata (Sharma *et al.* 2007). No obstante, la interferencia de componentes citosólicos puede causar importantes problemas. También, la ausencia de una referencia de ADN estándar (como convenio internacional) es otro problema que limita el uso de esta técnica (Doležel y Bartoš 2005).

Progresos técnicos, como la hibridación *in situ* (Wilkinson 1992) y otras técnicas derivadas (FISH (McKeown *et al.* 1992), GISH (Wilkinson *et al.* 1995) y PRINS (Godsen *et al.* 1991)), han permitido el examen de regiones específicas de los cromosomas.

#### IV.1.3.3. Análisis genético

En los últimos años, los marcadores moleculares basados en el ADN han servido como herramienta importante para la evaluación de la homogeneidad genética y la fidelidad al tipo de plantas micropropagadas.

Los marcadores moleculares pueden variar en su abundancia genómica, nivel de polimorfismo detectado, especificidad de locus, reproducibilidad y exigencias técnicas (Spooner *et al.* 2005). Para el estudio de la variabilidad genética se han utilizado distintos marcadores moleculares:

- **RFLPs (*Restriction fragment length polymorphism*)**

Los RFLPs son una técnica ampliamente usada para el estudio del genoma de organismos, proporcionando una base molecular para el análisis de posibles diferencias. De hecho, estos marcadores constituyen una de las primeras técnicas utilizadas en el estudio de la variación somaclonal y han sido ampliamente usados en distintas especies. Kumar *et al.* (2011) señalaron que estos marcadores son fiables para el análisis de la fidelidad genética de plantas cultivadas y Bairu *et al.* (2011) indicaron que eran útiles en la detección temprana de variación somaclonal.

Los RFLPs son marcadores con un polimorfismo relativamente alto, herencia codominante y alta reproducibilidad. Las diferencias en los fragmentos se generan por sustituciones de nucleótidos o reordenamientos, como inserción o supresión, o polimorfismos de un solo nucleótido. No obstante, esta técnica es incómoda para las pruebas de fidelidad genética (Kumar *et al.* 2011) por el consumo de tiempo, la exigencia de reactivos caros y el requerimiento de gran cantidad de ADN genómico de alta calidad (Agarwal *et al.* 2008).

#### ▪ **RAPDs (*Randomly Amplified Polimorphic DNA*)**

En muchas ocasiones se han utilizado los RAPDs para la evaluación de la fidelidad genética de plantas micropropagadas (Asthana *et al.* 2011; Bhatia *et al.* 2011; Kumar *et al.* 2011; Singh *et al.* 2012).

Los marcadores RAPDs son populares por su aplicación simple, rápida y fácil. Además, no exigen un conocimiento previo de la secuencia de ADN, tienen una elevada abundancia genómica, están aleatoriamente distribuidos por el genoma y la amplificación mediante PCR requiere una escasa cantidad de ADN. No obstante, también presentan una serie de limitaciones entre las que se incluyen la herencia dominante (Agarwal *et al.* 2008) y la baja reproducibilidad entre laboratorios (Agarwal *et al.* 2008; Nookaraju y Agrawal 2012). De hecho, Bardakci (2001) detalló que la principal desventaja de esta técnica es que la amplificación de los fragmentos de ADN depende de las condiciones de la reacción, que pueden variar entre laboratorios diferentes y, como varios loci discretos en el genoma se amplifican por cada cebador, los RAPDs no son capaces de distinguir los individuos heterocigóticos de los homocigóticos (Bardakci 2001).

En olivo, los RAPDs fueron los primeros marcadores de ADN utilizados en la identificación varietal (Bogani *et al.* 1994) y han sido aplicados en diferentes países como Italia (Fabbri *et al.* 1995; Cresti *et al.* 1997), España (Rubio y Arus 1997; Belaj *et al.* 1999; Belaj *et al.* 2001; Sanz-Cortes *et al.* 2001; Belaj *et al.* 2004b; Martín y Rallo 2005), Israel (Wiesman *et al.* 1998) y Australia (Mekuria *et al.* 1999; Guerin *et al.* 2002). Incluso han permitido detectar la existencia de polimorfismos dentro del cultivar en tres variedades portuguesas (Gemas *et al.* 2000) y dos españolas (Belaj *et al.* 2004a).

#### ▪ **AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)**

La tecnología de los AFLPs (Vos *et al.* 1995) se desarrolló para superar la falta de reproducibilidad de los RAPDs. Los pares de cebadores usados en los AFLPs, generalmente producen de 50 a 100 bandas por muestra. Las amplificaciones por prueba dependen del número de nucleótidos seleccionados en la combinación de cebador AFLP, motivo de nucleótido seleccionado, contenido en GC, tamaño y complejidad del genoma. La técnica de AFLP genera huellas dactilares de cualquier ADN independientemente de su fuente y sin conocimiento previo de la secuencia de ADN. La técnica puede ser utilizada para distinguir individuos estrechamente relacionados a nivel de subespecie (Althoff *et al.* 2007) y para mapear genes.

Los AFLPs son marcadores altamente reproducibles aunque el resultado puede verse afectado por el método de extracción y la cantidad del ADN utilizado (Meudt y Clarke 2007).

#### ▪ **SSRs (*Simple Sequence Repeats*)**

Los microsatélites consisten en cortas secuencias de uno a seis nucleótidos de longitud repetidas en tándem (Hajeer *et al.* 2000). Son muy variables y están ampliamente distribuidos a lo largo del genoma, localizándose especialmente en las zonas del centrómero y los telómeros. Este tipo de ADN repetido es común en los eucariotas y el número de unidades varía ampliamente a través de los organismos (Vicente y Fulton 2003). Los polimorfismos se generan por cambios (pérdida o ganancia) en el número de repeticiones. Este fenómeno es diferente al que se da en los AFLPs y RAPDs, donde la detección de los polimorfismos se da por mutaciones en un solo nucleótido (Powell *et al.* 1996).

Los microsatélites se consideran uno de los mejores marcadores debido a su alta tasa de mutación en comparación con otras zonas del genoma nuclear.

- **SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*)**

Los SNPs son variaciones de un solo nucleótido en la secuencia del genoma de los individuos de una población. Los SNPs constituyen los marcadores moleculares más abundantes en el genoma y están ampliamente distribuidos, aunque su ocurrencia y distribución varía entre especies (Agarwal *et al.* 2008).

- **IRAPs (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*) y REMAPs (*Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism*)**

Recientemente se han usado técnicas basadas en las secuencias transponibles para evaluar la variación somaclonal tales como IRAPs y REMAPs (Smýkal *et al.* 2007). La dispersión, ubicuidad y prevalencia de los retrotransposones en el genoma vegetal proporcionan una base excelente para el desarrollo de marcadores. Contienen secuencias largas, definidas y conservadas que pueden ser usadas para la clonación de marcadores específicos y secuencias de acompañamiento.

En olivo se han aplicado distintos marcadores moleculares para estudios de mapeo (Lopes *et al.* 2009), diversidad (Lopes *et al.* 2009) e identificación de cultivares (Belaj *et al.* 2003). Sensi *et al.* (2003) usaron marcadores AFLPs y Terzopoulos *et al.* (2005) y Doveri *et al.* (2008) utilizaron marcadores SSRs en la identificación de cultivares de olivo, mientras que Omrani-Sabbaghi *et al.* (2007) los usaron para el estudio de la diversidad genética de colecciones de olivo iraníes. Reale *et al.* (2006) fueron los primeros en desarrollar SNPs, para la identificación de variedades de esta especie, algunas de las cuales pertenecían al Banco de Germoplasma Mundial de Olivo. En estudios posteriores se han detectado nuevos SNPs en olivo (Muleo *et al.* 2009; Santos-Macedo *et al.* 2009; Hakim *et al.* 2010).

#### **IV.1.4. Variación somaclonal debida al proceso de embriogénesis somática**

La obtención de plántulas mediante embriogénesis somática directa se ha indicado que da lugar a material genéticamente uniforme (Rani y Raina 2000) mientras que la obtención de plantas vía callo se considera menos fiable para la propagación clonal (Varshney *et al.* 2001). No obstante, la posibilidad de variación somaclonal no puede ser de entrada descartada (Nookaraju y Agrawal 2012) y la estabilidad genética de las plantas obtenidas debe ser evaluada en cada caso. El análisis debe realizarse lo antes posible, especialmente en especies leñosas, con ciclos de vida prolongados, de manera que los efectos negativos que puedan expresarse en fases avanzadas del desarrollo no impliquen un impacto económico importante (Marum *et al.* 2009). La evaluación precoz de la estabilidad genética de estas plantas a través de marcadores moleculares es deseable antes de la explotación rutinaria de la técnica (Rai *et al.* 2012).

Se ha demostrado la presencia de variación somaclonal en árboles de *Coffea arabica* propagados vía embriogénesis somática (Etienne y Bertrand 2003). Basándose en caracteres fenotípicos, Söndal y Lauritis (1992) estimaron que el 10% de los árboles de café regenerados a partir de callos embriogénicos fueron variantes. También se han descrito casos de variación somaclonal en cultivos embriogénicos de coníferas tales como *Larix decidua* (Von Aderkas *et*



*al.* 2003), *Picea abies* (Burg *et al.* 1999), *Picea glauca* (De Verno *et al.* 1999) y *Pinus sylvestris* (Burg *et al.* 2007).

#### IV.1.5. Variación somaclonal debida al proceso de crioconservación

El número de especies y cultivares crioconservados ha crecido de forma rápida en los últimos años (Tsai *et al.* 2009; Hua y Hong 2010). La conservación de germoplasma en NL se supone que se lleva a cabo en condiciones que aseguran la estabilidad genética del material. Sin embargo, diversos procesos asociados al cultivo *in vitro* y a los procedimientos de conservación pueden causar variaciones (Srivastava *et al.* 2009; Konieczny *et al.* 2010). Los efectos de la crioconservación sobre el genoma de las plantas son a menudo desconocidos (Surenciski *et al.* 2007). Por lo tanto, es importante controlar la estabilidad genética del material vegetal después de la conservación en NL.

La estabilidad genética de las plantas procedentes de la crioconservación puede ser evaluada mediante análisis fenotípico, citológico, bioquímico o molecular, a través de una amplia variedad de técnicas (Harding y Benson 2000). Los marcadores basados en el ADN han sido utilizados de forma rutinaria para el control de la estabilidad genética del germoplasma.

Distintas investigaciones han utilizado marcadores moleculares, como los RAPDs (Rani *et al.* 1995; Munthali *et al.* 1996; Touchell y Dixon 1996; Gagliardi *et al.* 2003; Martín y González-Benito 2005; Sánchez *et al.* 2008) y los AFLPs (Turner *et al.* 2001; Fernandes *et al.* 2008; Peredo *et al.* 2008), para la evaluación de la estabilidad genética después de la crioconservación. En ninguno de estos estudios se encontraron diferencias en los marcadores de ADN antes y después de la crioconservación. Aronen *et al.* (1999) encontraron diferencias en cultivos embriogénicos de *Abies cephalonica*, pero no en los cultivos tratados y crioconservados. Con marcadores RAPDs, Sánchez *et al.* (2008) detectaron polimorfismos en un ES de *Quercus robur* crioconservado usando un procedimiento basado en la vitrificación. Kaity *et al.* (2008) también encontraron modificaciones en el ADN de plántulas de papaya regeneradas a partir de de ápices conservados usando una técnica de crioconservación basada en la vitrificación. En crisantemo, Martín y González-Benito (2005) detectaron variaciones en el perfil de RAPDs en una de las plántulas regeneradas a partir de ápices crioconservados mediante un protocolo de deshidratación-encapsulación. Sin embargo, plántulas de *Grammatophyllum speciosum* obtenidas a partir de protocormos crioconservados utilizando vitrificación en gota, vitrificación-encapsulación y deshidratación-encapsulación no mostraron características anormales o cambios en el nivel de ploidia cuando se analizaron mediante la citometría de flujo (Sopalun *et al.* 2010).

Hasta el año 2010, de las 64 publicaciones sobre estabilidad genética de plantas crioconservadas, solo se describieron 7 variaciones genéticas y 9 epigenéticas en las plantas regeneradas (Mikula 2010). En muchas ocasiones, las variaciones fueron debidas al uso de procedimientos de cultivo *in vitro* que no garantizaban la estabilidad genética durante el precultivo o la fase de recuperación. No obstante, la exposición prolongada a temperaturas muy bajas, el estrés osmótico o algunos componentes, como el DMSO, también pueden provocar mutaciones o cambios en la metilación del ADN (Martín y González-Benito 2006; Martín y González-Benito 2009). Harding (2004) señaló que la inestabilidad genética después de la crioconservación se debe principalmente a las condiciones de estrés del cultivo de tejidos y/o a los tratamientos previos a la crioconservación, que pueden causar estrés osmótico o toxicidad química, más que a la exposición a bajas temperaturas.

## IV.2. Material y métodos

### IV.2.1. Evaluación de la estabilidad genética de plantas regeneradas vía embriogénesis somática

#### IV.2.1.1. Material vegetal

Se evaluó la estabilidad genética de plantas de olivo, cultivar ‘Picual’, obtenidas vía embriogénesis somática a partir de cultivos mantenidos *in vitro* mediante subcultivos repetitivos durante diferentes periodos de tiempo.

Siguiendo el protocolo de embriogénesis somática detallado en el apartado II.2 de esta memoria, se regeneraron plantas a partir de líneas embriogénicas mantenidas en medio de proliferación durante 2 (líneas T1, T2, T4 y T5) y 8 años (líneas P1, P2, P3 y P5). En algunos casos se obtuvo más de una planta por ES germinado, bien porque el embrión diera lugar a varios brotes o por multiplicación *in vitro* del brote obtenido en la fase de germinación.

Paralelamente, y en las mismas condiciones utilizadas para los ES, se llevó a cabo la germinación de semillas para obtener plantas control, con las que comparar las obtenidas a partir de cultivos embriogénicos. Tanto las plántulas obtenidas de la germinación de ES como las procedentes de EZ se multiplicaron, enraizaron y aclimataron a condiciones *ex vitro* de acuerdo con el apartado II.2. Seis meses después de la aclimatación, las plantas fueron transferidas a invernadero (Fig. 69).



**Figura 69.** Aspecto general en umbráculo de las plantas obtenidas vía embriogénesis somática y a partir de semillas, 6 meses después de la aclimatación.

#### IV.2.1.2. Análisis fenotípico

##### ▪ Material vegetal

El análisis fenotípico se llevó a cabo mediante comparación de las plantas somáticas con las plantas control, procedentes de semillas.

En una primera aproximación se consideró solo la primera planta obtenida de cada ES,



mientras que en una segunda aproximación se consideraron todas las plantas producidas.

Al igual que en otras investigaciones sobre variación somaclonal en plantas regeneradas vía embriogénesis somática (Tremblay *et al.* 1999), el número de plantas evaluadas por línea no fue homogéneo, debido a la existencia de diferencias entre líneas embriogénicas en la eficiencia de las diferentes fases del proceso. Así, cuando se consideró solo la primera planta obtenida de cada ES, el número de plantas evaluadas en las líneas jóvenes osciló entre 15 y 51 por línea, mientras que en las líneas antiguas se evaluaron entre 8 y 18 plantas por línea. El número de plantas control analizadas fue 17. Cuando se evaluaron todas las plantas obtenidas, el número de plantas evaluadas por línea varió entre 18 y 110 en las líneas jóvenes, y entre 14 y 38 en las líneas antiguas. Estas plantas se compararon con 24 plantas control.

#### ▪ Evaluación morfológica

Cuatro años después del traslado de las plantas a invernadero, en cada una de ellas se evaluaron las siguientes características: longitud del tallo principal, diámetro del tallo principal, hábito de crecimiento, estructura de la ramificación, número de brotes axilares, filotaxia, morfología foliar, floración, estructura floral y fructificación.

#### ▪ Análisis de datos

Para determinar el efecto del genotipo y el tiempo de cultivo sobre la aparición de variantes somaclonales, los datos de porcentaje se analizaron mediante análisis de frecuencias utilizando el test de independencia  $R \times C$ . Para el resto de datos se realizaron ANOVA y las medias se separaron mediante el test DMS (Sokal y Rohlf 2003). El nivel de significación fue 0,05 en todos los casos.

Con el fin de identificar individuos con valores atípicos o extremos de longitud del tallo principal, diámetro del tallo principal y número de brotes axilares, se realizaron diagramas de cajas para cada uno de estos parámetros.

### IV.2.1.3. Análisis con marcadores moleculares

La estabilidad genética se evaluó utilizando marcadores RAPDs.

#### ▪ Material vegetal

El material vegetal se recolectó dos años después del traslado de las plantas al invernadero. Se seleccionaron 6 plantas procedentes de semillas y 6 de cada una de las líneas P1, P2, P3, P5, T1, T2, T4 y T5, basándose en la presencia de malformaciones fenotípicas. En todos los casos se muestrearon hojas recién formadas, de aproximadamente 1,5-2,5 cm de longitud. El material recolectado se limpió con alcohol al 70% (v/v) y se almacenó a -80°C hasta su análisis.

#### ▪ Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Gawel y Jarret (1991) modificado por Martin *et al.* (2008). La concentración de ADN en cada extracto se estimó mediante electroforesis en geles de agarosa.

▪ **Técnica RAPD**

○ **Amplificación mediante PCR**

La amplificación se llevó a cabo con los primers de Operon Technologies (Alameda/CA, EE.UU.) que se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 13.** Secuencia de los primers y concentración utilizada de cada uno de ellos.

Primer	Secuencia	Concentración utilizada (μM)
O10	TCAGAGCGCC	10
O20	ACACACGCTG	10
B15	GGAGGGTGTT	10
B7	GGTGACGCAG	20
F1	ACGGATCCTG	10
F3	CCTGATCACC	20
F4	GGTGATCAGG	10
F10	GGAAGCTTGG	10
A11	CAATCGCCGT	10

Las amplificaciones de ADN se realizaron en un volumen de 25 μl con aproximadamente 10-20 ng de ADN total, dNTP 0,8 mM, Cl<sub>2</sub>Mg 3 mM, cada uno de los primers a la concentración indicada en la Tabla 13 y 1 unidad de Taq ADN polimerasa en tampón para PCR comercial (Biotools) 1x.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador 'DNA Thermal Cycler 480' (Perkin-Elmer Cetus), según la siguiente secuencia de ciclos programados:

- 1 ciclo a 94°C durante 1 min.
- 35 ciclos: 92°C durante 45 s.  
37°C durante 1 min.  
72°C durante 2 min.
- 1 ciclo a 72°C durante 10 min.

Con la finalidad de comprobar la reproducibilidad de la amplificación, para cada primer se realizaron al menos dos reacciones de amplificación con cada una de las muestras.

### ○ **Electroforesis de los productos amplificados**

Los productos de ADN amplificados se mezclaron con tampón de carga y se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (p/v) en tampón TBE 1x. Justo después de la electroforesis, los geles se incubaron en bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 10 min y a continuación se lavaron con agua destilada durante 20-25 min para retirar el exceso de este compuesto. Las bandas obtenidas se visualizaron con luz ultravioleta y se fotografiaron con una cámara digital Kodak DC 290. El tamaño de los productos de la amplificación se estimó usando el marcador de peso molecular de ácidos nucleicos '100 base-Pair Ladder' (GE).

### ○ **Análisis de datos**

Los productos de las amplificaciones se registraron como presentes (1) o ausentes (0). A partir de la matriz de presencias y ausencias se creó una matriz de similitud utilizando el coeficiente de Jaccard (1908), definido por la expresión:

$$GS(ij) = a/(a + b + c)$$

donde:

a es el número de fragmentos polimórficos de ADN en común en los individuos.

b es el número de fragmentos presentes en i y ausentes en j

c es el número de fragmentos presentes en j y ausentes en i

La matriz resultante se sometió a análisis de agrupamiento mediante la aplicación SAHN siguiendo el método UPGMA (Unweighted Pair-Group method with Arithmetic Mean). A partir de los resultados de agrupamiento se construyó el dendrograma. Estos análisis se llevaron a cabo utilizando el programa NTSYS-pc ('Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System') versión 2,2 (Rohlf 1992).

## **IV.2.2. Evaluación de la estabilidad genética de plantas crioconservadas**

### **IV.2.2.1. Material vegetal**

Se evaluó la estabilidad genética de plantas de olivo, cultivar 'Picual', obtenidas a partir de cultivos embriogénicos de la línea P5 procedentes directamente del stock o establecidos a partir de ES crioconservados, con o sin precultivo en medio con alta concentración de sacarosa. La crioconservación se llevó a cabo tal y como se indica en el apartado III.2.2 y la obtención de plantas se realizó como se especifica en el apartado II.2.

### **IV.2.2.2. Análisis fenotípico**

El análisis fenotípico se llevó a cabo mediante comparación de las plantas obtenidas a partir de cultivos crioconservados, con (Sac/+NL) o sin (+NL) precultivo durante 7 días en medio con 0,2 M de sacarosa, con plantas control, regeneradas a partir de cultivos no crioconservados. El número de plantas evaluadas por tratamiento osciló entre 6 y 16 (8 plantas en el tratamiento control, 6 en el tratamiento +NL y 16 en el tratamiento Sac/+NL). En este experimento solo se analizó la primera planta obtenida de cada ES.

Seis meses después del traslado de las plantas al invernadero, en cada una de ellas se evaluaron las características indicadas en el apartado IV.2.1.2.

El análisis de datos se llevó a cabo utilizando las herramientas que se detallan en el apartado IV.2.1.2.

#### **IV.2.2.3. Análisis con marcadores moleculares**

El análisis con marcadores RAPDs se llevó a cabo siguiendo la misma metodología que en el estudio sobre estabilidad genética de plantas regeneradas vía embriogénesis somática (apartado IV.2.1.3.).

En este caso se seleccionaron 6 plantas por tratamiento, muestreando hojas jóvenes, de aproximadamente 1,5-2,5 cm de longitud, que se recolectaron 16 meses después de la aclimatación.

### IV.3. Resultados

#### IV.3.1. Evaluación de la estabilidad genética de plantas regeneradas vía embriogénesis somática

##### IV.3.1.1. Análisis fenotípico

La comparación morfológica de las plantas obtenidas vía embriogénesis somática con plantas control, procedentes de semilla, puso de manifiesto la existencia de 14 fenotipos variantes, asociados a las características previamente indicadas en Material y Métodos (apartado IV.2.1.2.).

En relación a la disposición de las hojas en el tallo (Fig. 70), se encontraron los siguientes fenotipos variantes:

- El tipo V4, correspondiente a plantas con cuatro hojas en el entrenudo (verticilo cuádruple). Este tipo de filotaxia solo apareció en el tallo principal.
- El tipo E, correspondiente a plantas con hojas alternas, es decir, con una sola hoja por verticilo.



**Figura 70.** Fenotipos en relación a la disposición de las hojas observados en plantas de olivo regeneradas vía embriogénesis somática: C) Dos hojas opuestas, disposición característica de las plantas control, V4) verticilo cuádruple y E) hojas en disposición alterna. Barra = 1 cm.

La estructura del tallo también varió en algunos casos respecto a la observada normalmente en las plantas control (Fig. 71):

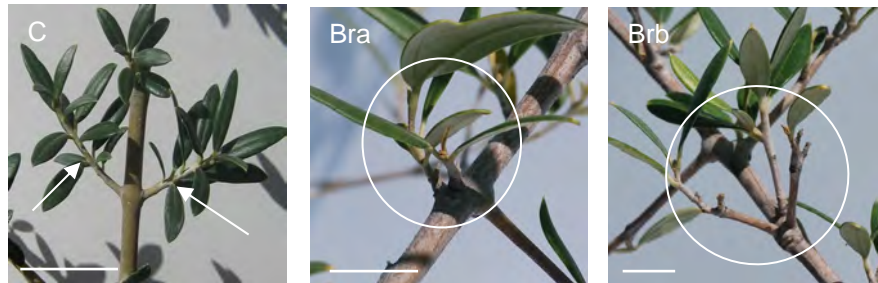
- El tipo Mult corresponde a plantas en las que los tallos se dividieron en tres ramificaciones.



**Figura 71.** Fenotipos en relación a la estructura del tallo observados en plantas de olivo regeneradas vía embriogénesis somática: C) Morfología del tallo característica de las plantas control y Mult) ramificación en tres ramas. Barra = 15 cm.

También se observaron fenotipos variantes relacionados con la formación de brotes axilares (Fig. 72):

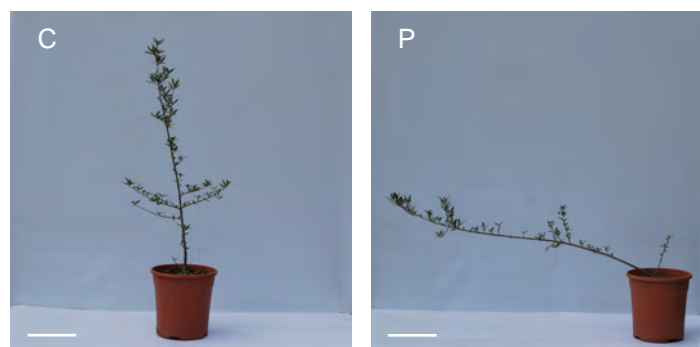
- La variación Br hace referencia a plantas con tres brotes en el mismo verticilo. Dos de los brotes podían aparecer dispuestos de forma paralela y opuestos al tercero (Bra) o los tres podían aparecer en la misma zona (Brb) (Fig. 72).



**Figura 72.** Fenotipos en relación a la formación de brotes axilares observados en plantas de olivo regeneradas vía embriogénesis somática: C) Brotes axilares opuestos, con la disposición observada normalmente en plantas procedentes de semilla. Formación de tres brotes axilares: Bra) Dos de ellos opuestos al tercero o Brb) los tres dispuestos en la misma zona. Barra = 1 cm.

El hábito de crecimiento de la planta también presentó un fenotipo variante (Fig. 73):

- El fenotipo P hace referencia a un crecimiento plagiotrópico, en vez del crecimiento ortotrópico característico de las plantas de olivo procedentes de semilla. Para la mayoría de los genotipos en los que este fenotipo fue inicialmente detectado, el crecimiento plagiotrópico revirtió a ortotrópico durante el crecimiento de las plantas en el umbráculo. Solo las plantas indicadas en las Tablas 14 y 15 mantuvieron esta morfología después de 4 años en el invernadero.



**Figura 73.** Hábito de crecimiento C) ortotrópico y P) plagiotrópico. Barra = 15 cm.

También se identificaron una serie de fenotipos variantes relacionados con la morfología foliar (Fig. 74):

- El tipo HD hace referencia a la presencia de hojas dobles, con dos nervios centrales. Dentro del mismo se distinguieron diferentes fenotipos variantes: En HD1 y HD2 ambos nervios aparecieron separados a nivel del peciolo pero mientras que en HD1 el limbo estaba dividido de forma simétrica (a distintas distancias del peciolo, lo que dio lugar a los fenotipos HD1a, HD1b y HD1c), en HD2 lo estaba de forma asimétrica. En los casos en los que los dos nervios no se

separaron a nivel del peciolo sino en el limbo, también se distinguieron diferentes fenotipos variantes dependiendo de la forma del limbo: sin apenas división (HD3), dividido en dos partes asimétricas (HD4) o con contorno irregular (HD5) (Fig. 74).



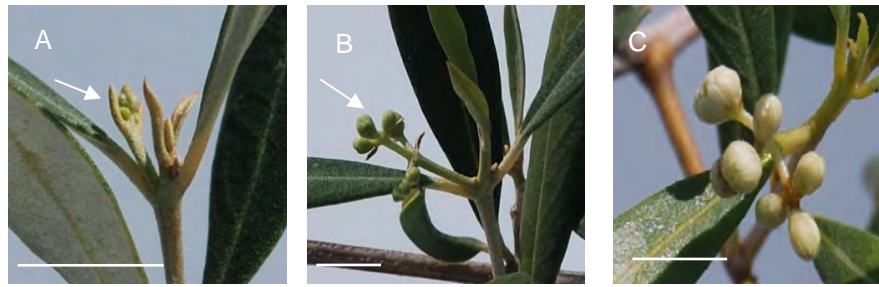
**Figura 74.** Morfologías observadas en hojas de plantas de olivo regeneradas vía embriogénesis somática: Hoja característica de las plantas de olivo procedentes de semilla (C), hojas con dos nervios centrales y el limbo dividido simétricamente a distintos niveles (HD1a, HD1b y HD1c), hoja con dos nervios centrales y el limbo dividido de forma asimétrica (HD2) y hojas con un nervio central común que se divide en dos partes distales unidas (HD3), separadas de forma asimétrica (HD4) o con contorno irregular (HD5). Barra = 1 cm.

Tres años y medio después de la aclimatación, se observó el desarrollo de flores en plantas de las líneas P1 y T4. Las flores de las plantas de la línea P1 (Fig. 75) se iniciaron 10-17 días antes que las de la línea T4.

En las plantas de la línea P1 se formaron 3-13 inflorescencias por planta, con 2-10 flores por panícula. En las plantas de la línea T4, sin embargo, solo se observó 1 inflorescencia por planta, con 1-3 flores en cada caso. Las inflorescencias se desarrollaron a partir de yemas



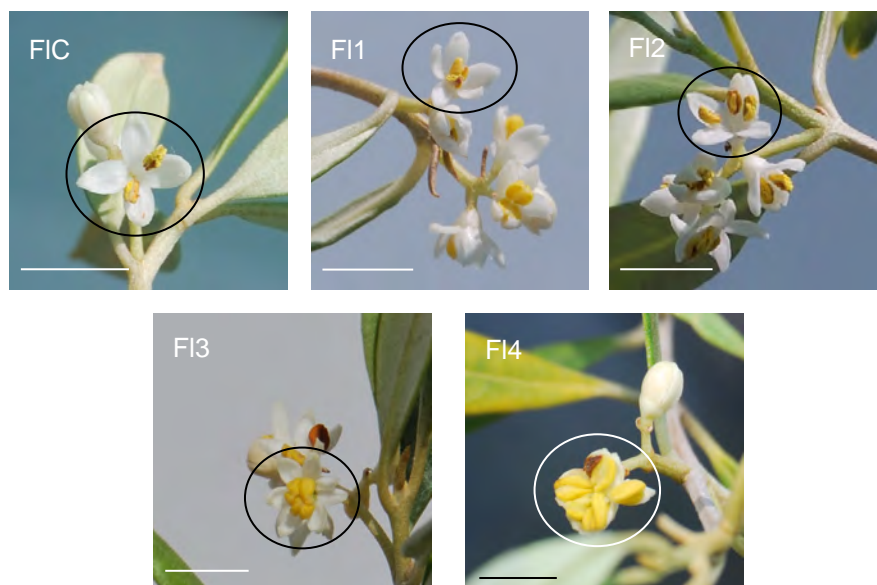
axilares o del meristemo apical del brote. Se desarrollaron tanto flores perfectas (hermafroditas) como imperfectas (masculinas), aunque fueron más abundantes estas últimas.



**Figura 75.** Iniciación (A) y desarrollo (B y C) de flores en plantas de la línea embriogénica P1. Barra = 1 cm.

Se observaron alteraciones en la estructura de la flor, con un aumento del número de pétalos y estambres en relación a la flor normal de olivo, que presenta 4 pétalos y 2 estambres (Gómez del Campo y Rapoport 2008). De acuerdo con estas modificaciones, se distinguieron diferentes tipos de flores variantes (Fig. 76):

- Tipo FI1, correspondiente a flores compuestas de 5 pétalos y 2 estambres.
- Tipo FI2, correspondiente a flores compuestas de 5 pétalos y 3 estambres.
- Tipo FI3, correspondiente a flores compuestas de 7 pétalos y 3 estambres.
- Tipo FI4, correspondiente a flores con 5 estambres y más de 7 pétalos.



**Figura 76.** Fenotipos de flores observados en plantas de olivo regeneradas vía embriogénesis somática. FIC) Flor con 4 pétalos y 2 estambres, característica de las plantas control procedentes de semilla, FI1) flor con 5 pétalos y 2 estambres, FI2) flor con 5 pétalos y 3 estambres, FI3) flor con 7 pétalos y 3 estambres y FI4) flor con 5 estambres y más de 7 pétalos. Barra = 1 cm.

En una planta de cada una de las líneas (P1 y T4) se observó la formación de frutos (Fig. 77).



**Figura 77.** Desarrollo del fruto en plantas de olivo regeneradas vía embriogénesis somática: A) Inicio, B) desarrollo y C) maduración del fruto en una planta de la línea T4. Barra = 1 cm.

La aparición de variaciones fenotípicas no se presentó de forma homogénea en todas las líneas estudiadas ni en todas las plantas de cada línea.

Cuando solo se consideró la primera planta obtenida de cada ES, las frecuencias de aparición de los diferentes fenotipos variantes variaron considerablemente, oscilando entre el 1,96 y el 83,33% (Tabla 14). En general, la frecuencia de aparición de los fenotipos variantes fue mayor en las líneas antiguas que en las jóvenes. Además, algunos de los fenotipos variantes, como V4, Br, HD2, HD3, HD4, HD5 y FI3, solo aparecieron en plantas regeneradas a partir de cultivos mantenidos durante 8 años. No obstante, parte de este efecto de debió a la línea P1, que acumuló muchas de las variaciones. De hecho, los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la existencia de morfologías anormales específicas de una línea embriogénica, como es el caso de los fenotipos V4, HD2, HD3, HD4, HD5 y FI3, que solo pudieron observarse en plantas de la línea P1.

El porcentaje de fenotipos variantes (número de fenotipos variantes/número total de plantas evaluadas) fue significativamente mayor ( $P = 0,0001$ ) en las líneas antiguas, con un 27,78% frente a un 5,98% obtenido en las líneas jóvenes (Tabla 14). No obstante, el genotipo tuvo un efecto muy importante ( $P = 8,70 \cdot 10^{-9}$ ) sobre este resultado, siendo P1 fue la línea que presentó más anomalías (83,33%), mientras que P2 y P3 no presentaron ninguna alteración morfológica.

En lo que se refiere al porcentaje de plantas regeneradas que presentaron fenotipos variantes, el análisis estadístico puso de manifiesto un efecto significativo tanto del genotipo ( $P = 0,0000$ ) como de la edad del cultivo ( $P = 8,49 \cdot 10^{-6}$ ) (Tabla 16). La línea P1, con un 91,67%, es la que dio lugar a más plantas con variaciones, mientras que a partir de las líneas P2 y P3 no se regeneró ninguna planta variante. En general, las líneas antiguas presentaron un porcentaje de plantas con fenotipos variantes más elevado que las líneas jóvenes (44,44% frente a 12,82%) aunque, como se apuntó anteriormente, el efecto solo se debió a parte de las líneas testadas.

Cuando se consideraron todas las plantas obtenidas, se apreció un aumento en el número de variaciones morfológicas detectadas (Tabla 15) ya que los fenotipos FI2 y FI4 solo se apreciaron cuando se tuvieron en cuenta todas las plantas obtenidas. En este caso, la frecuencia de aparición de fenotipos variantes osciló entre el 0,91 y el 76,47%, dependiendo del fenotipo y de la línea. Al igual que cuando solo se consideró la primera planta obtenida por ES, la frecuencia de aparición de los fenotipos variantes fue, en general, mayor en las líneas antiguas que en las jóvenes.

Los fenotipos variantes nuevamente detectados (FI2 y FI4) estuvieron relacionados con la estructura floral y, por lo tanto, solo fueron observados en plantas de las líneas P1 y T4.

**Tabla 14.** Frecuencias de aparición de fenotipos variantes en cada genotipo considerando solo la primera planta obtenida por ES germinado. N<sup>a</sup>) número de fenotipos variantes/número total de plantas y %) porcentaje de fenotipos variantes. Evaluación realizada 4,5 años después de la aclimatación.

Fenotipo Línea	V4	E	Mult	Br	P	HD1	HD2	HD3	HD4	HD5	FI1	FI3	Total	
													N <sup>a</sup>	%
Control	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0/17	0,00
P1	8,33	83,33	0,00	16,67	0,00	58,33	16,67	25,00	8,33	8,33	8,33	8,33	10/12	83,33a
P2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0/8	0,00c
P3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0/18	0,00c
P5	0,00	75,00	6,25	6,25	12,50	6,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5/16	31,25b
<b>Total</b>	<b>1,85</b>	<b>40,75</b>	<b>1,85</b>	<b>5,56</b>	<b>3,70</b>	<b>14,81</b>	<b>3,70</b>	<b>5,56</b>	<b>1,85</b>	<b>1,85</b>	<b>1,85</b>	<b>1,85</b>	<b>15/54</b>	<b>27,78a</b>
T1	0,00	15,00	0,00	0,00	0,00	5,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2/20	10,00bc
T2	0,00	46,67	0,00	0,00	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2/15	13,33bc
T4	0,00	0,00	0,00	0,00	3,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,23	0,00	2/31	6,45c
T5	0,00	0,00	1,96	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1/51	1,96c
<b>Total</b>	<b>0,00</b>	<b>8,55</b>	<b>0,85</b>	<b>0,00</b>	<b>1,71</b>	<b>0,85</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,85</b>	<b>0,00</b>	<b>7/117</b>	<b>5,98b</b>

**Tabla 15.** Frecuencias de aparición de fenotipos variantes en cada genotipo considerando todas las plantas obtenidas por ES germinado. N<sup>a</sup>) número de fenotipos variantes/número total de plantas y %) porcentaje de fenotipos variantes. Evaluación realizada 4,5 años después de la aclimatación.

Fenotipo Línea	V4	E	Mult	Br	P	HD1	HD2	HD3	HD4	HD5	FI1	FI2	FI3	FI4	Total	
															N <sup>a</sup>	%
Control	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0/24	0,00
P1	4,55	68,18	0,00	13,64	0,00	36,36	18,18	22,73	9,09	9,09	9,09	4,55	4,55	4,55	12/22	54,55a
P2	0,00	7,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1/14	7,14bc
P3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0/38	0,00c
P5	0,00	76,47	5,88	5,88	11,76	5,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5/17	29,41ab
<b>Total</b>	<b>1,1</b>	<b>31,87</b>	<b>1,1</b>	<b>4,4</b>	<b>2,20</b>	<b>9,90</b>	<b>4,40</b>	<b>5,49</b>	<b>2,20</b>	<b>2,20</b>	<b>2,2</b>	<b>1,10</b>	<b>1,10</b>	<b>1,10</b>	<b>18/91</b>	<b>19,78a</b>
T1	0,00	10,00	0,00	0,00	0,00	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2/30	6,67bc
T2	0,00	50,00	0,00	0,00	5,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2/18	11,11b
T4	0,00	0,00	0,00	0,00	2,38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,38	4,76	0,00	0,00	3/42	7,14bc
T5	0,00	0,00	0,91	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1/110	0,91c
<b>Total</b>	<b>0,00</b>	<b>6,00</b>	<b>0,50</b>	<b>0,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,50</b>	<b>1,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>8/200</b>	<b>4,00b</b>

**Tabla 16.** Porcentaje de plantas somáticas con fenotipos variantes.

Tratamiento		Porcentaje de plantas somáticas con fenotipos variantes	
Edad (años)	Línea embriogénica	1ª planta /ES germinado	Total de plantas /ES germinado
Control		0,00	0,00
8	P1	91,67a	86,36a
	P2	0,00d	7,14cd
	P3	0,00d	0,00d
	P5	81,25ab	82,35ab
Media		44,44a	37,36a
2	T1	20,00c	16,67c
	T2	53,33b	55,56b
	T4	6,45cd	9,52c
	T5	1,96d	0,91d
Media		12,82b	10,00b

El porcentaje de fenotipos variantes continuó siendo significativamente mayor ( $P = 2,87 \cdot 10^{-5}$ ) en las líneas mantenidas durante 8 años (19,78% en líneas antiguas frente a 4,00% en las jóvenes). El genotipo también tuvo un efecto significativo ( $P = 6,50 \cdot 10^{-10}$ ) sobre el porcentaje de variantes fenotípicas. La línea P1 fue la que acumuló más variaciones con un 54,55% frente a la línea P3 en la que no se observó ningún fenotipo variante. A pesar del elevado número de plantas producidas a partir de cultivos de la línea T5 (110), el porcentaje de variación en este genotipo fue muy bajo (0,91%).

En relación al porcentaje de plantas con caracteres variantes, también cuando se consideraron todas las plantas se observó un efecto significativo del genotipo ( $P = 0,0000$ ) y del tiempo de cultivo ( $P = 7,65 \cdot 10^{-8}$ ) (Tabla 16). La línea P1 continuó siendo la que más plantas variantes presentó y en P3 siguió sin aparecer ninguna alteración morfológica. El 37,36% de las plantas regeneradas a partir de líneas mantenidas *in vitro* durante 8 años presentaron variaciones fenotípicas, mientras que esto solo ocurrió en el 10% de las plantas obtenidas de líneas jóvenes.

El número de fenotipos variantes acumulados por planta también se vio afectado de forma significativa por ambos factores, genotipo ( $P = 0,0000$ ) y edad del cultivo ( $P = 0,0000$ ). El efecto observado fue el mismo independientemente de que se solo se considerara la primera planta producida o la totalidad de las mismas (Tabla 17).

**Tabla 17.** Acumulación de fenotipos variantes en plantas de olivo obtenidas vía embriogénesis somática.

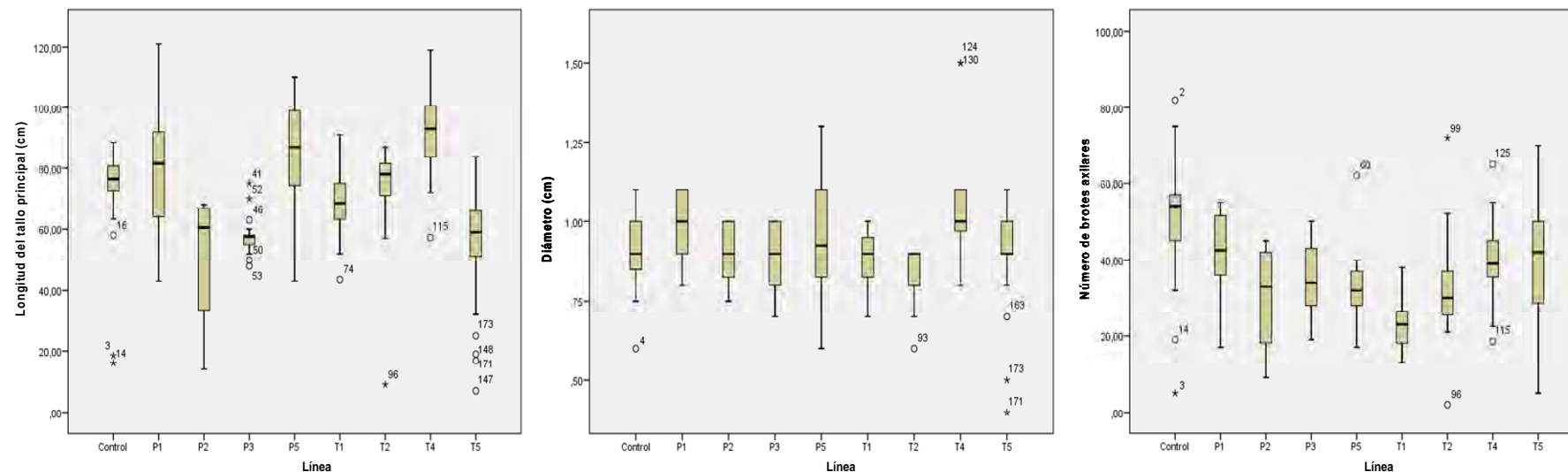
Tratamiento		Nº de fenotipos variantes/planta	
Edad (años)	Línea embriogénica	1ª planta /ES germinado	Total de plantas /ES germinado
Control		0,00	0,00
8	P1	2,42a	2,00a
	P2	0,00d	0,07d
	P3	0,00d	0,00d
	P5	1,06b	1,06b
<b>Media</b>		<b>0,85a</b>	<b>0,69a</b>
2	T1	0,20d	0,17d
	T2	0,53c	0,56c
	T4	0,06d	0,10d
	T5	0,02d	0,01d
<b>Media</b>		<b>0,13b</b>	<b>0,10b</b>

Como era de esperar, el análisis biométrico puso de manifiesto un efecto significativo del genotipo sobre todos los parámetros estudiados independientemente de si se consideraba solo la primera planta o todas las obtenidas ( $P = 0,0000$  para la longitud del tallo principal,  $P = 0,0002$  para el diámetro del tallo principal y  $P = 0,0000$  para el número de brotes axilares cuando solo se consideró la primera planta, y  $P = 0,0000$  para la longitud del tallo principal,  $P = 0,0001$  para el diámetro del tallo principal y  $P = 0,0000$  para el número de brotes axilares cuando se consideraron todas las plantas) (Tabla 18). Sin embargo, no se apreció una influencia de la edad del cultivo en ninguno de los parámetros testados (Tabla 18).

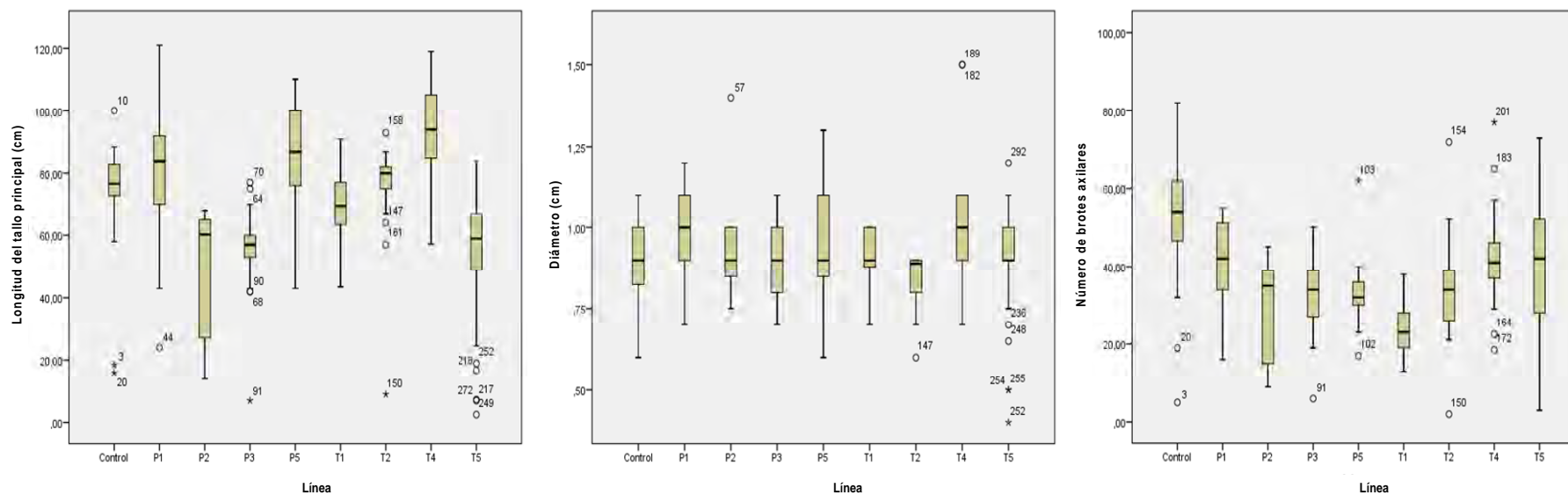
A pesar de que las plantas regeneradas a partir de cada línea deben ser teóricamente clonales, la representación en diagramas de cajas de los datos de longitud del tallo principal, diámetro del tallo principal y número de brotes axilares reveló la existencia de plantas con fenotipos variantes dentro de cada línea embriogénica, tanto cuando se consideró la primera planta por ES germinado (Fig. 78), como cuando se consideraron todas las plantas obtenidas (Fig. 79). Así, en los dos casos, para cada una de las variables evaluadas se observaron plantas con valores atípicos (es decir, menores que el percentil 25 o mayores que el percentil 75 pero dentro de 1,5 veces la altura de la caja) o extremos (es decir, con valores inferiores o superiores a la altura de la caja multiplicada por 3).

**Tabla 18.** Crecimiento de plantas de olivo obtenidas vía embriogénesis somática.

Tratamiento		1ª planta /ES germinado			Total de plantas /ES germinado		
Edad (años)	Línea embriogénica	Longitud (cm)	Diámetro (cm)	Nº de brotes axilares	Longitud (cm)	Diámetro (cm)	Nº de brotes axilares
Control		69,91	0,91	50,47	73,02	0,90	51,63
8	P1	80,25bc	0,98ab	41,29a	81,18bc	0,96ab	40,61ab
	P2	50,44d	0,90bcd	30,00b	49,71e	0,94ab	29,71b
	P3	58,00d	0,89bcd	35,22ab	55,34e	0,90bc	33,24b
	P5	84,94ab	0,95abc	33,00ab	86,35ab	0,95ab	33,18b
Media		69,81a	0,93a	35,14a	66,52a	0,93a	34,47a
2	T1	69,35c	0,89cd	23,28b	69,92d	0,90bc	23,27c
	T2	71,97c	0,84d	32,80ab	74,25cd	0,84c	33,78b
	T4	93,00a	1,02a	40,02a	94,52a	1,01a	41,94a
	T5	56,44d	0,92bc	39,96a	56,18e	0,92b	39,45ab
Media		70,33a	0,93a	36,21a	67,92a	0,93a	37,04a



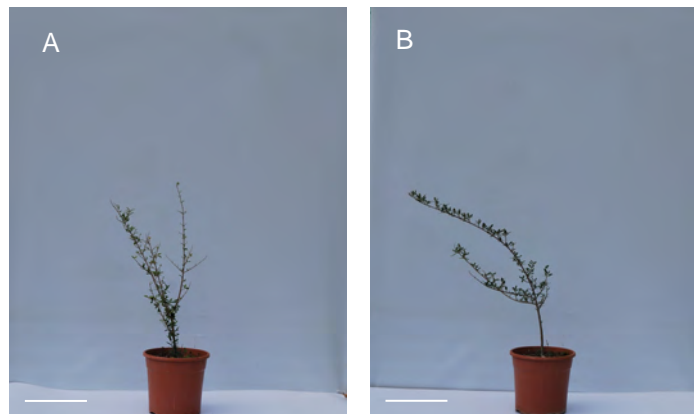
**Figura 78.** Diagramas de cajas para la longitud del tallo principal, diámetro del tallo principal y número de brotes axilares en plantas de olivo procedentes de semillas (Control) y de cultivos embriogénicos, antiguos (P) y jóvenes (T), considerando solo la primera planta obtenida por ES germinado. (°) valores atípicos v (\*) extremos.



**Figura 79.** Diagramas de cajas para la longitud del tallo principal, diámetro del tallo principal y número de brotes axilares en plantas de olivo procedentes de semillas (Control) y de cultivos embriogénicos, antiguos (P) y jóvenes (T), considerando todas las plantas obtenidas por ES germinado. (°) valores atípicos y (\*) extremos.



Cuando se analizó la longitud del tallo principal en la primera planta obtenida por ES se encontraron valores atípicos y extremos en las líneas P3, T1, T2, T4 y T5. Mientras que en la línea P3 se detectaron valores atípicos por encima y por debajo de la mediana, las líneas jóvenes (T1, T4 y T5) solo presentaron valores significativamente diferentes por debajo del percentil 25 (Fig. 78). En las líneas P3 y T2 también se obtuvieron valores extremos de longitud del tallo principal. Así, en la línea P3 se identificaron dos plantas (41 y 52) de gran altura (70 y 75 cm frente a 57,50 cm de mediana (58 cm de media)) (Fig. 80), mientras que en la línea T2 se identificó una planta (96) con una longitud del tallo principal muy pequeña (9 cm frente a 78,00 cm de mediana (71,97 cm de media)), debido a una alteración del crecimiento del ápice del tallo principal.

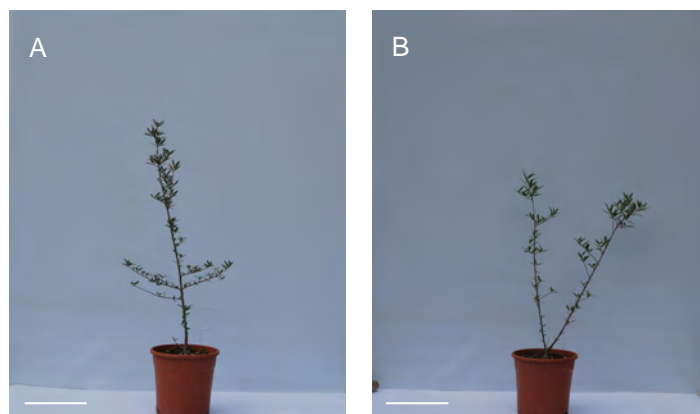


**Figura 80.** Plantas con estatura diferente regeneradas a partir de la misma línea embriogénica. (A), Planta de la línea P3 con un valor de longitud del tallo principal dentro de la caja y (B) planta de la línea P3 con un valor de longitud del tallo principal extremo. Barra = 15 cm.

También se observaron valores atípicos y extremos en relación al diámetro del tallo principal, aunque solo se dieron en las plantas regeneradas a partir de las líneas jóvenes T2, T4 y T5 (Fig. 78). Dependiendo de la línea, dichos valores se situaron por encima o por debajo de la mediana. Los valores extremos solo se dieron en dos plantas de la línea T4 (124 y 130), ambas con un diámetro del tallo principal de 1,5 cm frente a 1,00 cm de mediana (1,02 cm de media), y dos plantas de la línea T5 (171 y 173), con 0,40 y 0,50 cm de diámetro frente a 0,90 cm de mediana (0,92 cm de media)).

Cuando la variable evaluada fue el número de brotes axilares, se apreciaron menos plantas variantes (Fig. 78). Estas solo se identificaron en las líneas P5, T2 y T4. De ellas, solo una planta de la línea T2 (99) presentó un valor extremo de número de brotes (72 frente a 30 brotes de mediana (32,8 cm de media)).

Solo en cuatro plantas se acumularon varios de los fenotipos variantes identificados mediante biometría. Así, una planta de la línea T2 (96) presentó un valor extremadamente bajo de longitud del tallo acompañado de un valor atípico, por debajo de la mediana, de número de brotes. No obstante, no se trató de un individuo enano ya que la dominancia del crecimiento pasó a los brotes laterales (Fig. 81). Una planta regenerada a partir de cultivos de la línea T4 (115) presentó valores atípicos por debajo de la mediana para la longitud del tallo principal y el número de brotes axilares. En la línea T5, las plantas 171 y 173 presentaron valores atípicos de longitud del tallo principal y extremos de diámetro del tallo principal, en ambos casos por debajo de la mediana.



**Figura 81.** Plantas regeneradas a partir de cultivos de la línea T2: A) con valores de longitud del tallo principal dentro de la caja y B) con una alteración en el crecimiento del tallo principal. Barra = 15 cm.

El análisis estadístico de la longitud del tallo principal de todas las plantas obtenidas permitió la identificación de individuos con valores atípicos en todas las líneas salvo P2, P5, T1 y T4 (Fig. 79). Sin embargo, valores extremos solo se observaron en las líneas P3 y T2. Así, se identificaron dos plantas somáticas con valores extremos de longitud del tallo principal respecto al resto de plantas con el mismo origen: una en la línea P3 (91), con 7 cm frente a 57 cm de mediana (55,34 cm de media), y otra en la línea T2 (150), con 9 cm, ya identificada cuando solo se consideró la primera planta obtenida por ES.

En relación al diámetro del tallo principal, se detectaron valores atípicos en las líneas P2, T2, T4 y T5, mientras que valores extremos solo se observaron en la línea T5 (Fig. 79). Los valores atípicos se situaron por encima y por debajo de la mediana mientras que las plantas con valores extremos (252, 254 y 255) presentaron todos tallos más finos que el resto de plantas con su mismo origen (0,40 y 0,50 cm frente a 0,90 cm de mediana (0,92 cm de media)).

En el caso del número de brotes axilares, se observaron valores atípicos en las líneas P3, P5, T2 y T4 y extremos en las líneas P5 y T4 (Fig. 79). Las dos plantas con valores extremos presentaron más brotes que el resto de plantas regeneradas a partir de la misma línea. Así, la planta de la línea P5 (103) presentó 62 brotes frente a 32 de mediana (33,18 de media) y la de la línea T4 (201) 77 brotes frente a 41 de mediana (41,94 de media).

En algunas plantas se acumularon variaciones relacionadas con el crecimiento. Así, las plantas 91 y 150, de las líneas P3 y T2, respectivamente, presentaron un valor extremadamente bajo de longitud del tallo principal y valores atípicos, también bajos, de número de brotes. Dos plantas, de las líneas T2 (147) y T5 (252), presentaron tallos principales más cortos y delgados que el resto de plantas de su línea.

#### IV.3.1.2. Análisis con marcadores moleculares

Para la evaluación de la estabilidad genética de las plantas regeneradas a partir de cultivos embriogénicos mantenidos *in vitro* durante 2 y 8 años se analizaron 6 plantas por línea, las cuales se compararon con 6 plantas procedentes de semillas.

Cuando se analizaron los fragmentos de ADN obtenidos mediante RAPDs con los 9 primers seleccionados, se observaron un total de 118 marcadores con tamaños comprendidos entre 220 y 2000 pares de bases (pb). El total de bandas encontradas y su tamaño en pb se

recogen, para cada uno de los primers, en la Tabla 19.

**Tabla 19.** Número de fragmentos amplificados con cada primer y tamaño de los mismos.

Primer	Fragmentos RAPDs	Tamaño fragmentos (pb)
O10	19	480-2000
O20	11	470-1950
B15	14	300-1750
F10	20	220-2000
F1	8	610-1700
F3	9	510-1600
F4	8	450-900
B7	16	360-2000
A11	13	650-1900
<b>Total</b>	<b>118</b>	<b>220-2000</b>

De los 118 marcadores analizados, 35 resultaron monomórficos (29,70%) para las 54 muestras estudiadas.

Cuando solo se consideraron las plantas control, se detectaron 104 marcadores; es decir, 14 de las 118 bandas no aparecieron en las plantas procedentes de semilla. De estos 104 marcadores, 10 fueron exclusivos de las plantas control, no estando presentes en las plantas regeneradas a partir de cultivos embriogénicos, y 43 resultaron monomórficos (41,35%) para todas las plantas procedentes de EZ.

Cuando solo se consideraron las plantas somáticas, procedentes tanto de cultivos antiguos como jóvenes, se obtuvieron 108 bandas. Entre ellas, se identificaron 39 marcadores monomórficos, lo que representa un grado de similitud del 36,11%. De estas 108 bandas, 20 estuvieron presentes en los cultivos mantenidos *in vitro* durante 8 años pero no aparecieron en los mantenidos durante 2 años. No obstante, 14 de las 20 bandas se encontraron también en los controles, aunque no de forma homogénea, ni en estos últimos ni en las líneas antiguas.

En las plantas regeneradas a partir de las líneas jóvenes se detectaron 88 marcadores, de los que 49 resultaron monomórficos, dando lugar a un grado de similitud del 55,7%. De ellos, 10 fueron monomórficos para las líneas T y los otros 39 fueron monomórficos para todas las muestras analizadas.

El análisis de los patrones de bandas puso de manifiesto la existencia de diferencias evidentes entre las plantas procedentes de líneas embriogénicas distintas. Las líneas T2 y T4 presentaron 66 y 68 bandas, respectivamente, no detectándose ninguna variación dentro de cada línea. En las líneas T1 y T5 se detectaron 71 bandas en cada caso, observándose marcadores polimórficos en las dos líneas. En las plantas de la línea T5 solo se detectó un marcador polimórfico, consistente en un fragmento de 1060 pb amplificado con el primer O10,

lo que dio lugar a un 98,59% de similitud entre las plantas regeneradas a partir de esta línea (Fig. 82). En la línea T1 se detectaron 6 polimorfismos: 5 fragmentos de 1100, 900, 800, 750 y 470 pb amplificados con el primer F10 (Fig. 83) y un fragmento de 1090 pb amplificado con el primer B7 (Fig. 84), con lo que el grado de similitud fue del 91,55%.

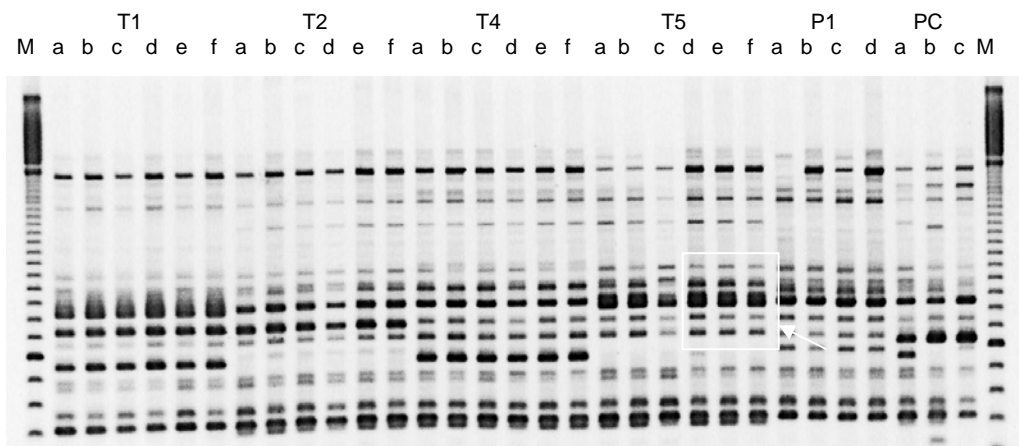
En las líneas antiguas (P) se detectaron 95 marcadores, 46 de los cuales fueron monomórficos: 7 de ellos para las líneas antiguas y 39 de forma general. En todas las líneas se detectaron marcadores polimórficos.

En las líneas P1, P2, P3 y P5 se identificaron 66, 69, 71 y 76 bandas, respectivamente. En todas ellas se observó una banda polimórfica, consistente en un fragmento de 1400 pb amplificado con el primer O20, presente en algunas plantas de cada línea y en otras no (Fig. 85). Si bien en las líneas P1 y P2 esta banda fue el único polimorfismo detectado, en las líneas P3 y P5 se identificaron dos polimorfismos más en cada una de ellas: los fragmentos de 650 y 550 pb amplificados con el primer F4 en la línea P3 (Fig. 86) y los fragmentos de 550 y 360 pb amplificados con el primer B7 en la línea P5 (Fig. 87).

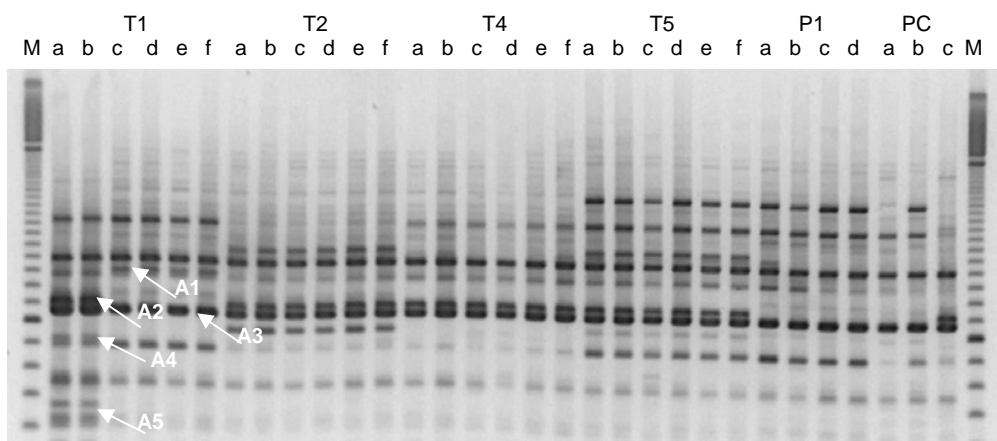
Las diferencias observadas se reflejan en el dendrograma obtenido a partir de la matriz de similitud (Fig. 88), en el que se identificaron los siguientes genotipos en cada una de las líneas embriogénicas: 3 en la línea T1, con 1, 2 y 3 individuos, cada uno de ellos; 1 en la línea T2 con 6 individuos, 1 en la línea T4 con 6 genotipos, 2 genotipos en la línea T5, con 3 individuos cada uno; 2 en la línea P1, con 4 y 2 individuos cada uno; 2 en la línea P2, con 5 y 1 individuos cada uno; 3 en la línea P3, con 3, 2 y 1 individuos cada uno, y 3 en la línea P5, con 1, 1 y 4 individuos cada uno.

A un nivel de similitud de aproximadamente el 63%, se separan dos grandes grupos, A y B. El grupo A lo forman todas las muestras de las líneas jóvenes, perfectamente agrupadas las muestras de cada línea, y una de las muestras control (PC2). El grupo B está formado por las líneas P2, P3, P5 y el resto de las muestras control. Las plantas de la línea P1 aparecen separadas de ambos grupos, presentando un grado de similitud con el resto de solo el 61%.

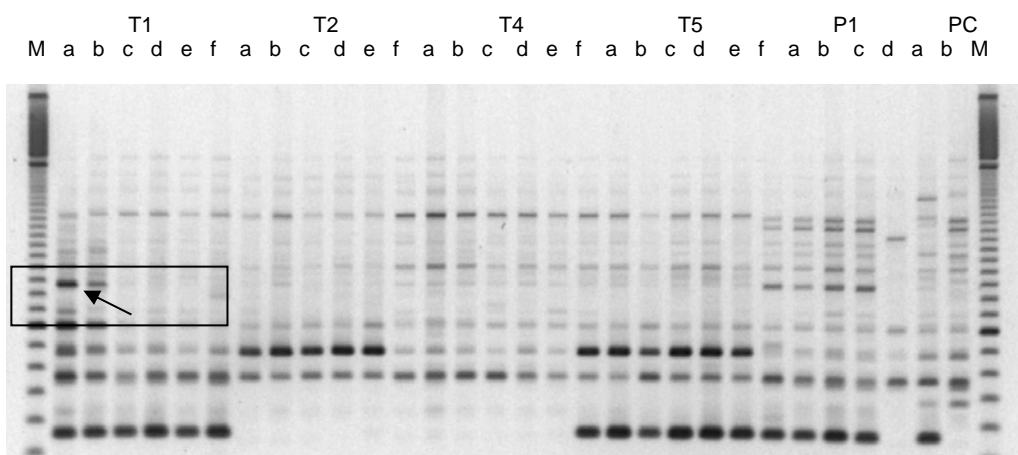
Los individuos regenerados a partir de las líneas T2 y T4 fueron idénticos (100% de similitud dentro de cada línea), mientras que en las líneas T1 y T5, la similitud entre individuos fue del 91,55% y el 98,59%, respectivamente. En las líneas embriogénicas antiguas, ninguna dio lugar a plantas que fueran todas idénticas, presentando todas las líneas al menos un individuo diferente al resto. Los porcentajes de similitud más elevados se obtuvieron en las líneas P2 y P1, con un 98,55 y un 98,48%, respectivamente. Valores algo más bajos se apreciaron en las plantas regeneradas a partir de las líneas P5 (96,05%) y P3 (95,77%).



**Figura 82.** Amplificación obtenida con el primer O10 en plantas de semillas (PC) y regeneradas a partir de las líneas T1, T2, T4, T5 y P1. Las letras a-f indican los individuos ensayados en cada línea. M es el marcador de peso molecular. La flecha señala una banda, correspondiente a 1060 pb, ausente en las plantas d, e y f de la línea T5.

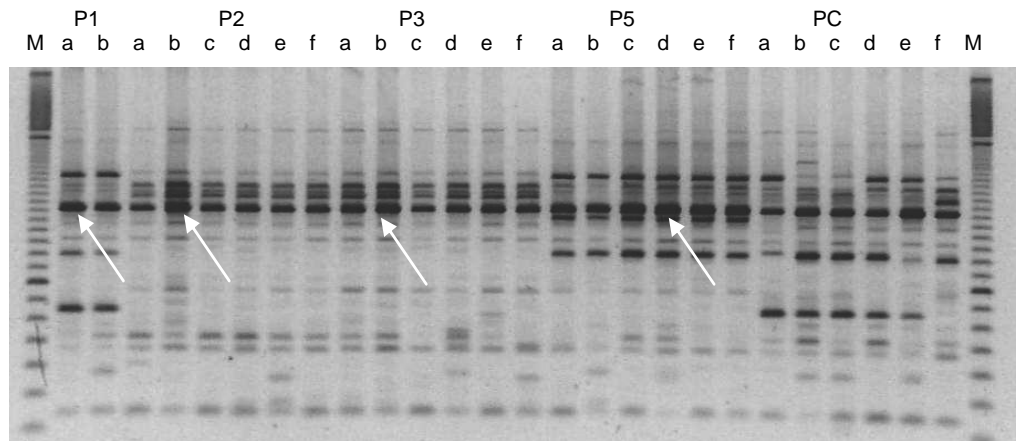


**Figura 83.** Amplificación obtenida con el primer F10 en plantas de semillas (PC) y regeneradas a partir de las líneas T1, T2, T4, T5 y P1. Las letras a-f indican los individuos ensayados en cada línea. M es el marcador de peso molecular. Las flechas señalan bandas nuevas observadas en plantas de la línea T1 (A1, A2, A3, A4 y A5 corresponden a 1100, 900, 800, 750 y 470 pb, respectivamente).

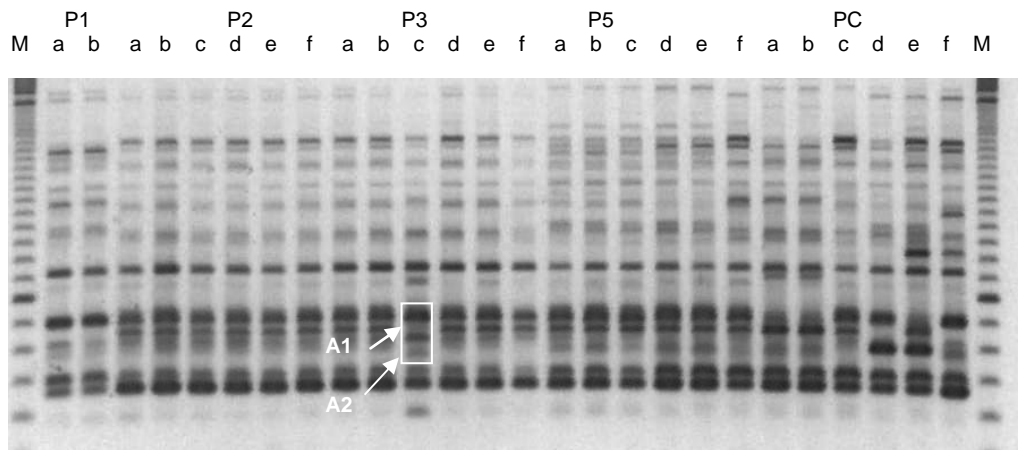


**Figura 84.** Amplificación obtenida con el primer B7 en plantas de semillas (PC) y regeneradas a partir de las líneas T1, T2, T4, T5 y P1. Las letras a-f indican los individuos ensayados en cada línea. M es el marcador de peso molecular. La flecha señala una banda nueva en la planta a de la línea T1 a nivel de 1090 pb.

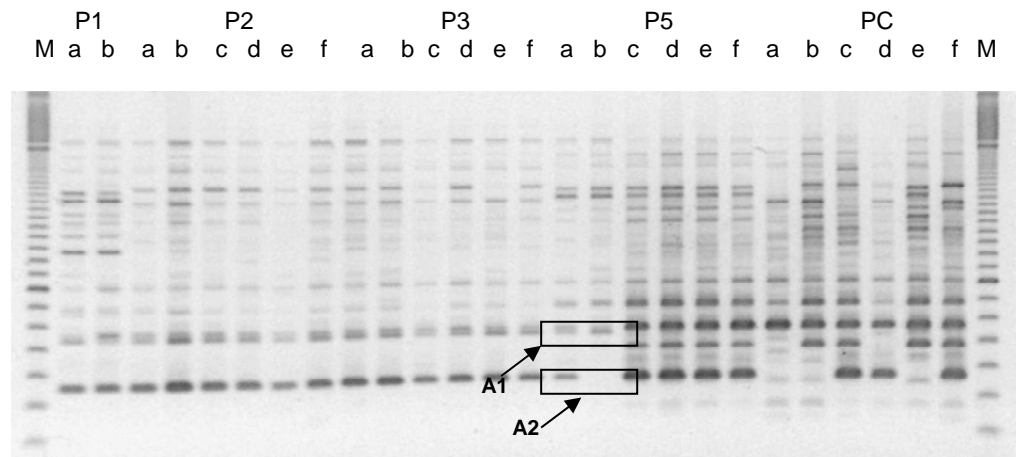




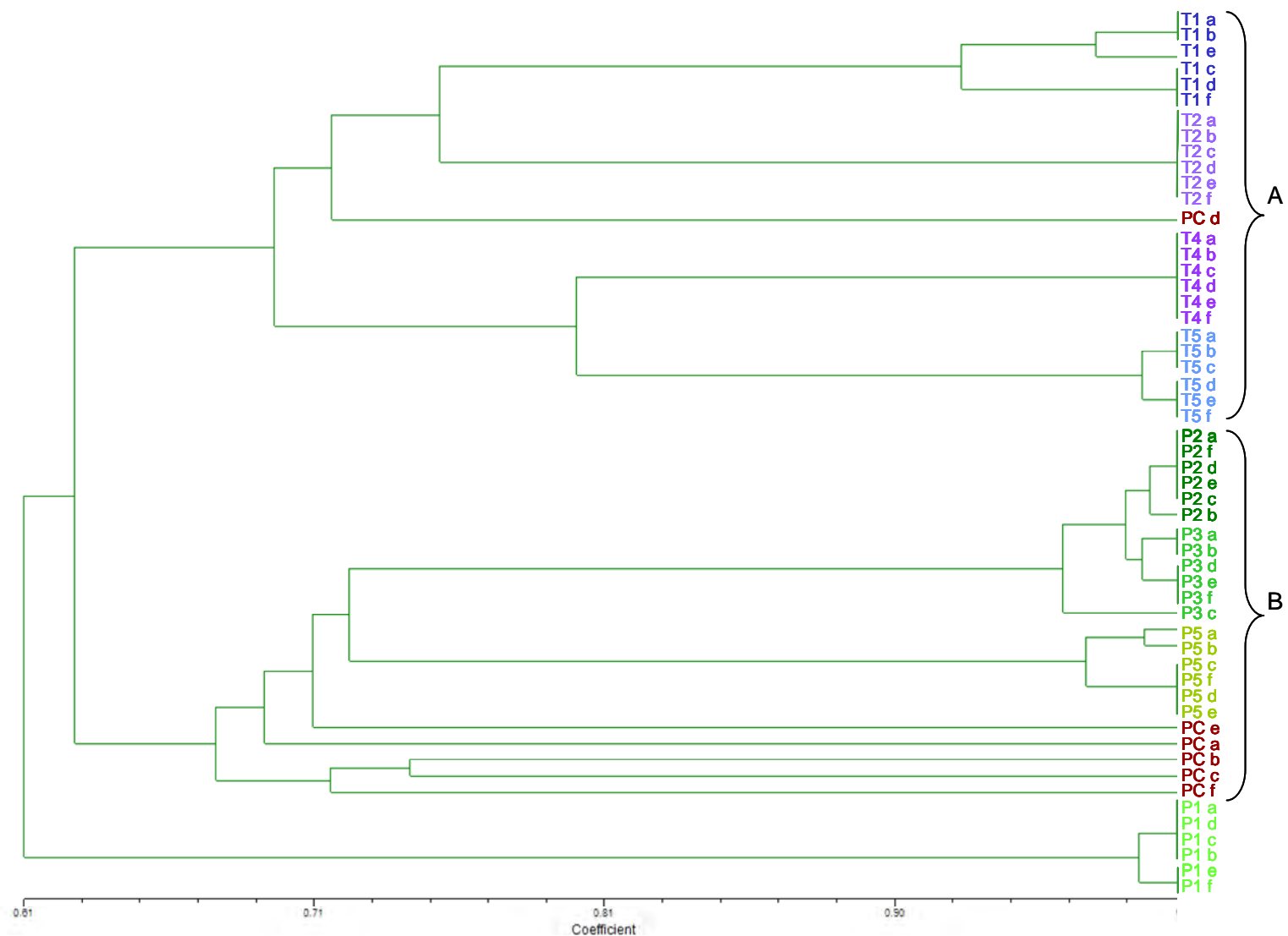
**Figura 85.** Amplificación obtenida con el primer O20 en plantas de semillas (PC) y regeneradas a partir de las líneas P1, P2, P3 y P5. Las letras a-f indican los individuos ensayados en cada línea. M es el marcador de peso molecular. Las flechas señalan una banda nueva a nivel de 1400 pb en las plantas a de P1, b de P2 y P3, y d de P5.



**Figura 86.** Amplificación obtenida con el primer F4 en plantas de semillas (PC) y regeneradas a partir de las líneas P1, P2, P3 y P5. Las letras a-f indican los individuos ensayados en cada línea. M es el marcador de peso molecular. Las flechas señalan una banda ausente (A1) y otra nueva (A2) correspondientes a 650 y 550 pb, respectivamente, en la planta c de la línea P3.



**Figura 87.** Amplificación obtenida con el primer B7 en plantas de semillas (PC) y regeneradas a partir de las líneas P1, P2, P3 y P5. Las letras a-f indican los individuos ensayados en cada línea. M es el marcador de peso molecular. Las flechas señalan una banda presente (A1) y otra ausente (A2) correspondientes a 550 y 360 pb, respectivamente, en plantas de la línea P5.



**Figura 88.** Dendrograma de plantas de olivo procedentes de semillas (PC) y de cultivos embriogénicos antiguos (P) y jóvenes (T) basado en marcadores RAPDs y generado por el método UPGMA usando el coeficiente de Jaccard (1908).



### IV.3.2. Evaluación de la estabilidad genética de plantas crioconservadas

En este trabajo se estudió el efecto de la crioconservación, con o sin tratamiento previo con sacarosa, sobre la estabilidad genética de las plantas regeneradas.

#### IV.3.2.1. Análisis fenotípico

Las plantas analizadas a nivel morfológico mostraron algunos de los fenotipos variantes descritos previamente en el estudio sobre el efecto del genotipo y la edad del cultivo en la variación somaclonal de plantas regeneradas vía embriogénesis somática (Tabla 20).

**Tabla 20.** Frecuencias de aparición de fenotipos variantes en plantas de la línea P5 procedentes de cultivos control y crioconservados, con (Sac/+NL) o sin tratamiento previo con sacarosa (+NL). N<sup>a</sup>) número de fenotipos variantes/número total de plantas y %) porcentaje de fenotipos variantes. Evaluación realizada 6 meses después de la aclimatación.

Fenotipo Tratamiento	E	HD1	P	Total	
				N <sup>a</sup>	%
Control	87,50	0,00	62,50	2/8	25a
+NL	83,33	33,33	100	3/6	50a
Sac/+NL	93,75	0,00	93,75	2/16	12,50a

La aparición de variaciones fenotípicas no tuvo lugar de forma homogénea en las plantas testadas. Las frecuencias oscilaron entre el 33,33 y el 100%, dependiendo del fenotipo y el tratamiento (Tabla 20). Los fenotipos E y P aparecieron con una frecuencia muy elevada en todos los tratamientos, mientras que HD1 solo fue detectado en las plantas crioconservadas sin tratamiento previo (+NL).

El análisis estadístico no mostró una influencia significativa del tratamiento sobre el porcentaje de fenotipos variantes. No obstante, el número de fenotipos variantes/número total de plantas evaluadas fue ligeramente más elevado en las plantas crioconservadas (50,00%) que en las plantas control (25,00%) o pretratadas con sacarosa y crioconservadas (12,50%).

La crioconservación, con o sin tratamiento previo con sacarosa, no afectó al porcentaje de plantas con fenotipos variantes (Tabla 21), ni al número de fenotipos variantes observados en cada planta (Tabla 22).

**Tabla 21.** Porcentaje de plantas con fenotipos variantes regeneradas a partir de cultivos control o crioconservados, sin o con tratamiento previo con sacarosa.

Tratamiento	Porcentaje de plantas con fenotipos variantes
Control	100a
+NL	100a
Sac/+NL	100a

**Tabla 22.** Acumulación de fenotipos variantes en plantas obtenidas a partir de cultivos control o crioconservados, sin o con tratamiento previo con sacarosa.

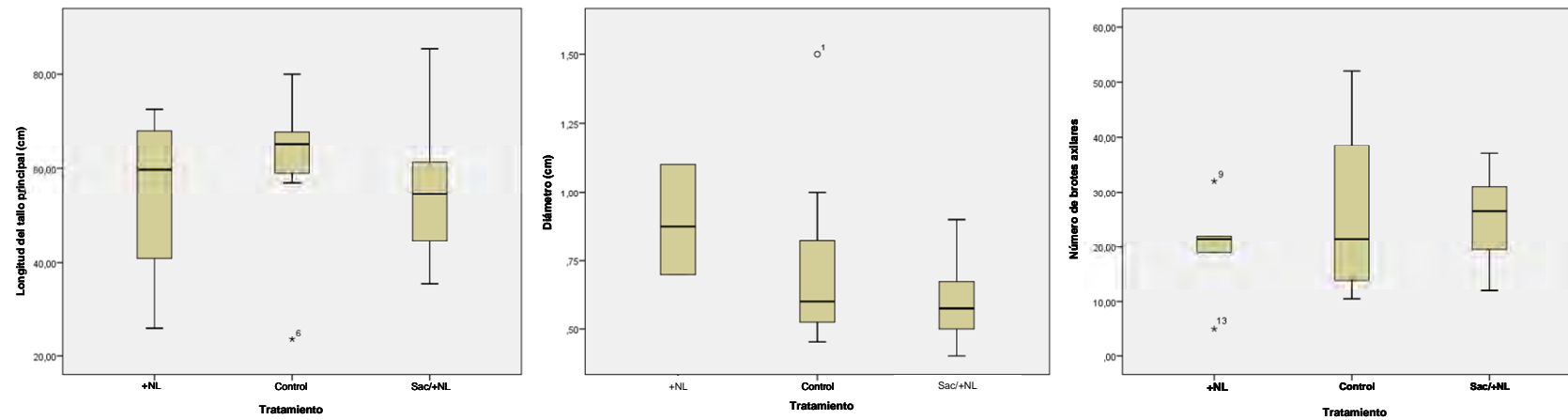
Tratamiento	Nº de fenotipos variantes/planta
Control	1,50a
+NL	2,17a
Sac/+NL	1,88a

El análisis biométrico de las plantas obtenidas a partir de cada uno de los tipos de cultivo puso de manifiesto una influencia significativa del tratamiento sobre el diámetro del tallo principal ( $P = 0,0349$ ), siendo las plantas procedentes de cultivos crioconservados las más gruesas (0,89 cm) y las obtenidas a partir de cultivos pretratados y crioconservados las más finas (0,60 cm) (Tabla 23); no obstante, en ningún caso las diferencias fueron significativas respecto al control. La longitud del tallo principal y el número de brotes no se vieron afectados por el tratamiento.

**Tabla 23.** Análisis biométrico de plantas obtenidas a partir de cultivos control o crioconservados, sin o con tratamiento previo con sacarosa.

Tratamiento	Longitud del tallo principal (cm)	Diámetro del tallo principal (cm)	Nº de brotes axilares
Control	60,94a	0,73ab	26,31a
+NL	54,48a	0,89a	20,17a
Sac/+NL	55,23a	0,60b	25,19a

Cuando se analizaron mediante estadística descriptiva los datos de longitud del tallo principal, diámetro del tallo principal y número de brotes axilares, solo se identificaron cuatro plantas con valores atípicos o extremos (Fig. 89). Así, a partir de cultivos no crioconservados se regeneró una planta (6) con una longitud del tallo principal extremadamente más baja que el resto (23,5 cm frente a 65,25 cm de mediana (60,94 cm de media)) y otra (1) con un valor atípico de diámetro del tallo por encima de la mediana (1,5 cm frente a 0,6 cm de mediana (0,73 cm de media)). A partir de los cultivos procedentes de explantos crioconservados sin precultivo con sacarosa se regeneraron dos plantas con valores extremos de número de brotes, una (9) por encima y otra (13) por debajo de la mediana (32 y 5, respectivamente, frente a 21,50 de mediana (20,17 de media)).



**Figura 89.** Diagramas de cajas para la longitud del tallo principal, diámetro del tallo principal y número de brotes axilares en plantas de la línea P5 regeneradas a partir de cultivos control y crioconservados, con (Sac/+NL) o sin tratamiento previo con sacarosa (+NL). (°) valores atípicos y (\*) extremos.

### IV.3.2.2. Análisis con marcadores moleculares

Para la evaluación de la estabilidad genética de cultivos crioconservados, se analizaron mediante marcadores RAPDs 6 muestras procedentes de plantas regeneradas a partir de cultivos control sin crioconservar, 6 procedentes de cultivos crioconservados sin tratamiento previo con sacarosa y 6 procedentes de cultivos crioconservados después de un precultivo durante 7 días con 0,2 M sacarosa.

Cuando se analizaron los fragmentos de ADN obtenidos mediante RAPDs con los 9 primers seleccionados, se observaron un total de 110 marcadores con tamaños comprendidos entre 220 y 2000 pb (Tabla 24).

**Tabla 24.** Número de fragmentos amplificados con cada primer y tamaño de los mismos.

Primer	Número de fragmentos RAPDs	Tamaño fragmentos (pb)
O10	10	510-2000
O20	10	470-1900
B15	13	300-1680
F10	16	220-2000
F1	11	610-1800
F3	12	410-1600
F4	16	450-2000
B7	12	360-1720
A11	10	550-2000
<b>Total</b>	<b>110</b>	<b>220-2000</b>

De los 110 marcadores analizados, 107 resultaron monomórficos (97,27%) para las 18 muestras estudiadas.

Cuando se consideraron solo las muestras de las plantas control, 108 de las 110 bandas fueron monomórficas, con 2 marcadores que aparecieron de forma específica en una de las plantas: un fragmento de 910 pb amplificado con el primer B7 y otro de 650 pb amplificado con el primer F3 (Figs. 90 y 91). El grado de similitud dentro de las plantas control fue del 98,18%.

Cuando se consideran solo las muestras de las plantas crioconservadas sin tratamiento previo (+NL), se detectaron 108 marcadores de los que 107 fueron monomórficos, ya que uno de ellos (fragmento de 1410 pb amplificado con el primer A11) desapareció en una de las plantas (Fig. 92). El grado de similitud que presentaron las plantas regeneradas a partir de cultivos crioconservados sin tratamiento previo fue del 99,07%.

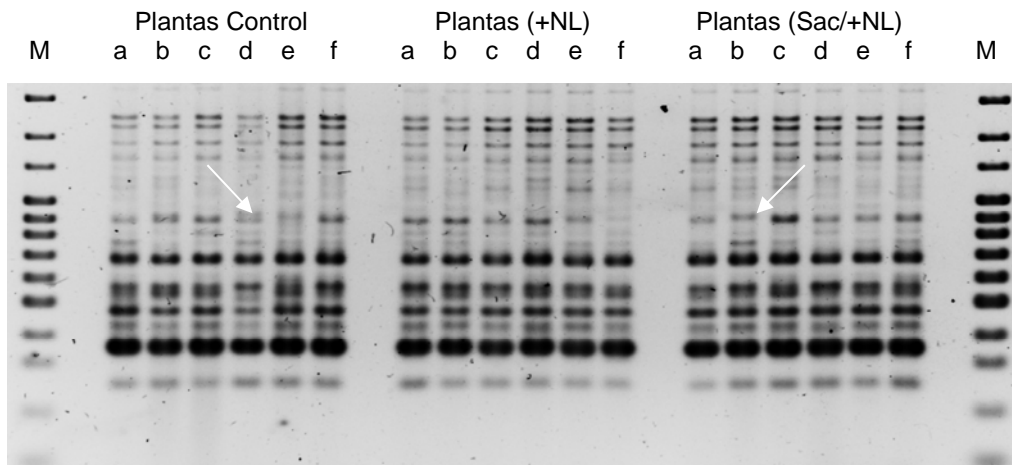
Cuando se consideran solo las muestras de las plantas congeladas después de un precultivo con sacarosa, se identificaron 110 marcadores, de los que 107 fueron monomórficos. Dos de los marcadores polimórficos fueron comunes a los que aparecieron en la planta control

variante (fragmento de 910 pb amplificado con el primer B7 y fragmento de 650 pb amplificado con el primer F3) y al igual que en aquel caso, ambos aparecieron en una única planta variante (Figs. 90 y 91). El tercer marcador polimórfico fue común al detectado en una de las plantas procedentes de cultivos crioconservados sin tratamiento previo (fragmento de 1410 pb amplificado con el primer A11) y, al igual que en aquel caso, consistió en la desaparición de la banda en una de las plantas regeneradas (Fig. 92). El grado de similitud entre las plantas pretratadas y crioconservadas fue del 97,27%.

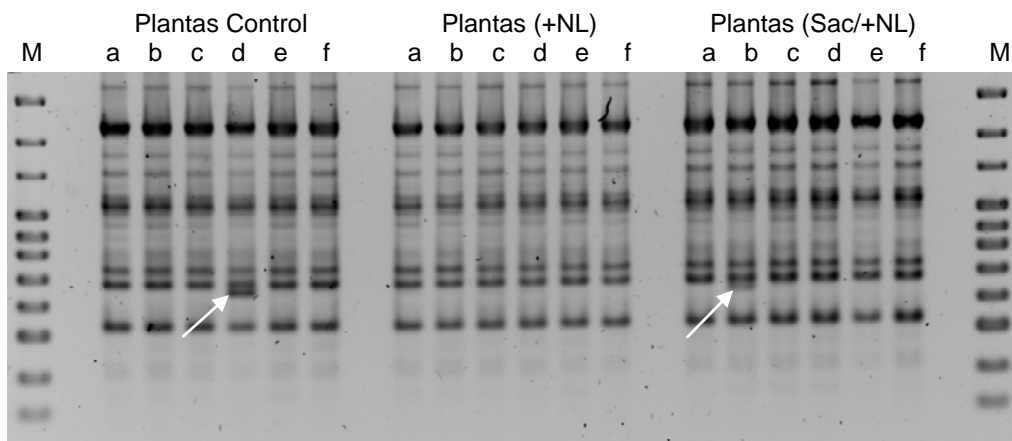
El marcador A11-1410 fue monomórfico para los individuos controles y polimórfico para los individuos procedentes de cultivos crioconservados (+NL y Sac/+NL), mientras que los marcadores F3-650 y B7-910 fueron monomórficos para las plantas procedentes de cultivos directamente congelados (+NL) y polimórficos para los individuos controles y los procedentes de cultivos tratados y congelados (Sac/+NL) (Figs. 90, 91 y 92). Todos los fragmentos amplificados con los primers O10, O20, B15, F10, F1 y F4 se comportaron como monomórficos para todas las muestras.

En el total de plantas, se identificaron 4 individuos variantes: 1 en el control, 1 en el tratamiento +NL y 2 en el tratamiento Sac/+NL (Figs. 90, 91 y 92).

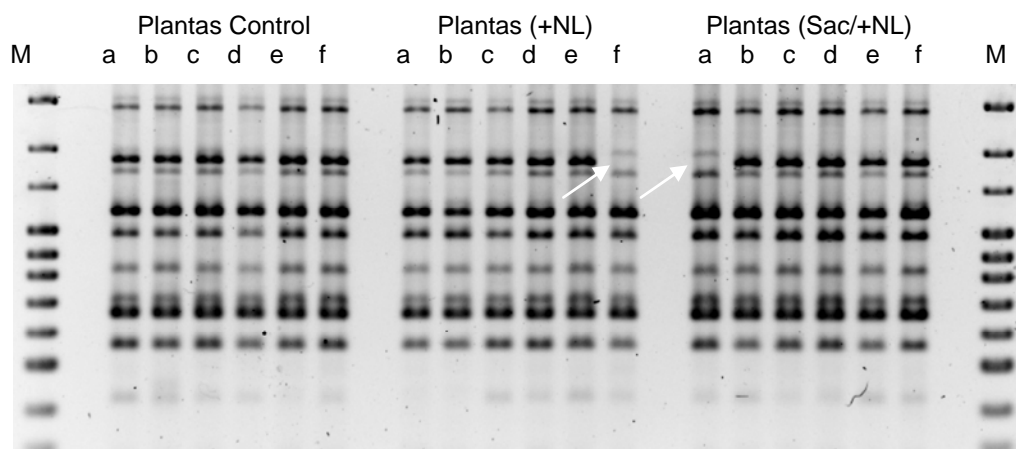
La representación de los resultados obtenidos en un dendograma (Fig. 93) permitió la identificación de 3 genotipos: el primero con 5 individuos del tratamiento control, 5 de +NL y 4 de Sac/+NL; el segundo genotipo con 1 planta de +NL y otra de Sac/+NL, y el tercero con 1 planta control y otra de Sac/+NL. La similitud entre los distintos genotipos fue muy elevada, del 98 y el 99%.



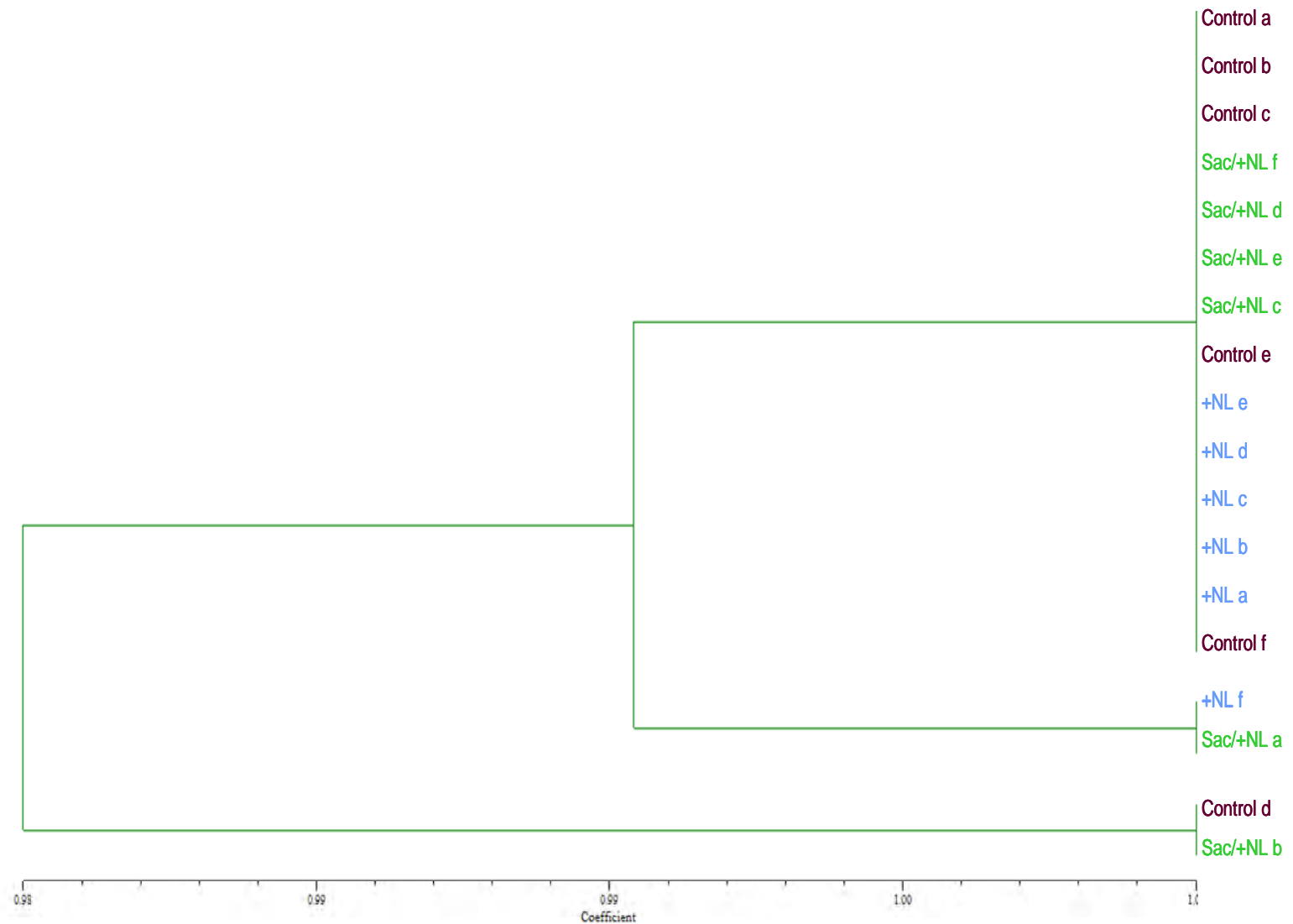
**Figura 90.** Amplificación obtenida con el primer B7 en plantas regeneradas a partir de cultivos control o crioconservados, directamente (+NL) o después de un precultivo con sacarosa (Sac/+NL). Las letras a-f indican los individuos ensayados en cada tratamiento. M es el marcador de peso molecular. Las flechas señalan una banda nueva a nivel de 910 pb aparecida en plantas Control (d) y Sac/+NL (b).



**Figura 91.** Amplificación obtenida con el primer F3 en plantas regeneradas a partir de cultivos control o crioconservados, directamente (+NL) o después de un precultivo con sacarosa (Sac/+NL). Las letras a-f indican los individuos ensayados en cada tratamiento. M es el marcador de peso molecular. Las flechas señalan una banda nueva a nivel de 650 pb aparecidas en plantas Control (d) y Sac/+NL (b).



**Figura 92.** Amplificación obtenida con el primer A11 en plantas regeneradas a partir de cultivos control o crioconservados, directamente (+NL) o después de un precultivo con sacarosa (Sac/+NL). Las letras a-f indican los individuos ensayados en cada tratamiento. M es el marcador de peso molecular. Las flechas señalan una banda a nivel de 1410 pb ausente en plantas +NL (f) y Sac/+NL (a).



**Figura 93.** Dendrograma de plantas de la línea P5 procedentes de cultivos control y crioconservados, con (Sac/+NL) o sin tratamiento previo con sacarosa (+NL) basado en marcadores RAPDs y generado por el método UPGMA usando el coeficiente de Jaccard (1908).



## IV. 4. Discusión

### IV.4.1. Evaluación de la estabilidad genética de plantas regeneradas vía embriogénesis somática

Los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto la existencia de variación somaclonal en plantas de olivo regeneradas vía embriogénesis somática.

#### IV.4.1.1. Análisis fenotípico

Las plantas de olivo obtenidas mediante embriogénesis somática mostraron variaciones fenotípicas cuando se compararon con plantas procedentes de semillas. Algunos de los caracteres variantes encontrados en este trabajo, como HD, habían sido previamente descritos en plantas de olivo obtenidas vía organogénesis adventicia (Cañas y Benbadis 1988). En plantas de olivo regeneradas vía embriogénesis somática, Leva *et al.* (2000) también describieron modificaciones en el hábito de crecimiento, distinguiendo dos tipos principales: BOS, consistente en plantas con porte arbustivo, y COS, consistente en plantas con una fuerte dominancia apical.

En otras especies se han detectado fenotipos variantes similares a los observados en la presente investigación, como la plagiotropía, descrita en plantas somáticas de *Pinus pinaster* (Marum *et al.* 2009), *Picea mariana* y *Picea glauca* (Tremblay *et al.* 1999). Al igual que en el presente trabajo, en la investigación llevada a cabo por Tremblay *et al.* (1999), el crecimiento plagiotrópico revirtió en muchos casos, persistiendo solo en algunos genotipos.

En plantas de otras especies arbóreas regeneradas vía embriogénesis somática se han descrito otros fenotipos variantes como enanismo, fasciación, variegación, modificación del ángulo de las ramas y de la forma de ramificación (Bajaj 1990; Hammerschlag 1992) o pérdida de la dominancia apical (Marum *et al.* 2009).

Además de las variaciones que afectaban a aspectos estructurales y morfológicos de la planta, el presente estudio también puso de manifiesto una variación fisiológica importante: el acortamiento del periodo juvenil. En olivo, el periodo juvenil puede alcanzar 10-15 años (Barranco *et al.* 2008). Sin embargo, 6 de las plantas obtenidas vía embriogénesis somática florecieron 3 años y medio después de la aclimatación. Además de la reducción del periodo juvenil, también se observaron variaciones en la estructura de la flor que afectaron al número de pétalos y estambres. En plantas de palma de aceite regeneradas vía embriogénesis somática también se apreciaron flores aberrantes, ya que estas desarrollaron un segundo verticilo de carpelos en lugar de estambres (Alwee *et al.* 2006). En la mayoría de los casos el fruto no se desarrolló adecuadamente (Corley *et al.* 1986), lo que podía causar importantes pérdidas económicas, más aún porque esta anomalía solo es detectable una vez que las palmeras comienzan a florecer, 2 ó 3 años después de su plantación. Eeuwens *et al.* (2002) realizaron un estudio para determinar los factores del cultivo de tejidos que causaron la aparición de estas flores malformadas y encontraron que el desorden se daba con más frecuencia en genotipos sensibles cuando se utilizaban periodos cortos de subcultivo y cuando se aplicaban altas concentraciones de citoquinina y bajas de auxina. El desorden no pareció estar relacionado con los niveles endógenos de citoquinina (Jones *et al.* 1995). Como esta alteración es un cambio típicamente homeótico, podrían estar implicadas alteraciones en los genes homeóticos que participan en la determinación de la identidad del órgano floral (Alwee *et al.* 2006). No obstante, a pesar de que se encontraron algunos cambios genéticos, no se observó una correlación con la ocurrencia de la aberración morfológica (Matthes *et al.* 2001).

Según Smulders y de Klerk (2011), ya que los cambios ocurrieron regularmente, se podría esperar que se debieran más a cambios epigenéticos que genéticos. Aunque también se encontraron cambios en la metilación del ADN entre las plantas regeneradas, tampoco esto pudo correlacionarse con la ocurrencia de la anormalidad (Jaligot *et al.* 2002).

Los fenotipos variantes no aparecieron de forma homogénea en las líneas estudiadas, con algunas que se podían considerar bastante estables y otras en las que se acumularon múltiples variaciones. Los genotipos más inestables fueron las líneas P1, P2, P5, T1, T2 y T4.

Según Tremblay *et al.* (1999), en *Picea abies*, el número de fenotipos variantes es independiente del número de plantas del mismo clon. Sin embargo, en la presente investigación se comprobó que el número de fenotipos variantes se hizo mayor al aumentar el número de plantas evaluadas. Un número mayor de copias podría ofrecer más oportunidades para la expresión de la variación somaclonal que probablemente se ha acumulado durante la fase de mantenimiento de los cultivos embriogénicos. Resultados similares han sido observados en diferentes sistemas de embriogénesis somática (Morrish *et al.* 1983; Symillides *et al.* 1995; Henry *et al.* 1996), en los que se ha documentado la aparición de variantes somaclonales en la progenie (Söndahl y Lauritis 1992; Etienne y Bertrand 2001).

En este trabajo se ha demostrado la influencia del genotipo y de la edad del cultivo sobre la aparición de variación somaclonal en plantas de olivo regeneradas vía embriogénesis somática.

Estudios previos en otras especies han identificado al genotipo como un factor fundamental en la aparición de variación somaclonal (Karp 1995) e importante en la determinación del tipo y la frecuencia de la variación (Jain *et al.* 1998; Etienne y Bertrand 2003).

En olivo, todos los genotipos, salvo la línea P3, mostraron alguna variación fenotípica, aunque con porcentajes variables. Mientras que en la línea T5 el porcentaje de plantas anormales fue del 0,91%, en otras se acercó al 90,00%. El genotipo más inestable fue la línea P1, con 12 fenotipos variantes en 22 plantas regeneradas (ó 10 fenotipos variantes en 12 plantas regeneradas, cuando solo se consideró la primera planta obtenida por ES).

El tiempo de mantenimiento también se ha descrito como un factor importante que afecta a la aparición de variación somaclonal (Sibi 1990; Skirvin *et al.* 1994). En olivo, el tiempo de mantenimiento de los cultivos embriogénicos tuvo un efecto significativo sobre la aparición de variaciones fenotípicas en las plantas regeneradas, observándose en general una acumulación de caracteres variantes a lo largo del tiempo. Muchos autores han señalado la influencia del tiempo de mantenimiento de los cultivos embriogénicos sobre la variación somaclonal. De hecho, se espera un aumento de la proporción de variantes somaclonales con el número de ciclos de multiplicación o la longitud del tiempo de cultivo (Lörz y Scowcroft 1983; Preil 1986; Cassells y Morrish 1987; Benzion y Phillips 1988; Hartmann *et al.* 1989; Wang *et al.* 1992; Yang *et al.* 1999). Sin embargo, para Tremblay *et al.* (1999) este factor parece secundario en comparación con el efecto del genotipo. No obstante, estos autores señalaron que el efecto del tiempo de mantenimiento está probablemente subestimado ya que un incremento del mismo va normalmente acompañado de una disminución de las capacidades regenerativas de las líneas celulares y los estudios solo consideran las plantas regeneradas en crecimiento. En plantas de *Foeniculum vulgare* regeneradas vía organogénesis y embriogénesis somática no se encontraron cambios genéticos después de 9 y 17 meses de cultivo (Bennicci *et al.* 2004).

La aparición de variantes somaclonales tras el proceso de embriogénesis somática se ha descrito en muchas especies (Jain *et al.* 1998). En *Solanaceae*, se han observado casos de variación somaclonal en tabaco (Chaleff y Ray 1984), tomate (Evans y Sharp 1983; Evans *et al.*

1984) y patata (Shepard *et al.* 1980).

En olivo, Shibli *et al.* (2001) y Mencuccini y Rugini (1993) observaron que las plantas regeneradas *in vitro* vía organogénesis eran fenotípicamente similares entre sí y a aquellas producidas por micropropagación a partir de yemas axilares. Leva *et al.* (1995) señalaron que las plantas somáticas establecidas en invernadero mostraron un crecimiento normal, sin cambios de rendimiento. Por lo contrario, Cañas y Benbadis (1988) detectaron variaciones en plantas regeneradas mediante organogénesis a partir de cotiledones de EZ. La detección de estas variaciones puede depender de la forma de evaluación que, como se indicó anteriormente, puede realizarse a través de diferentes aproximaciones (Sweldlund y Vasil 1985; Shenoy y Vasil 1992; Chawdhury *et al.* 1994; Saieed *et al.* 1994; Högborg *et al.* 2003). En nuestro caso es razonable pensar que ha sido observada más variación somaclonal que en trabajos previos llevados a cabo en esta especie debido a que se han evaluado de forma sistemática un número mayor de plantas y utilizando diferentes parámetros.

La dominancia apical puede tener un efecto pronunciado sobre el crecimiento y la forma de las ramas individuales y contribuye de forma significativa a la apariencia general del árbol (Zimmerman y Brown 1980). Aspectos de la forma del árbol como la cantidad de ramas y el grado de dominancia apical están bajo control genético (Kramer y Kozlowski 1979). En nuestro estudio se observaron plantas fuera del tipo o con valores extremos de longitud del tallo principal en una planta de la línea P3 y en otra de la línea T2. En estos casos, la dominancia apical se había perdido o alterado por causas desconocidas. Piagnani *et al.* (2008) señalaron que brotes de los somaclones HS de *Prunus avium* crecidos *in vitro* mostraron una dominancia apical reducida en comparación con el tipo silvestre, confirmándose en plantas aclimatadas este comportamiento. Respecto al diámetro del tallo principal, también se encontraron plantas variantes en mayor o menor medida. Este parámetro es un factor importante para la evaluación del vigor de la planta y suele estar altamente correlacionado con el tamaño del árbol (Miller y Tworowski 2003). Los resultados obtenidos también pusieron de manifiesto la existencia de plantas con valores atípicos y extremos de número de brotes, parámetro que también está relacionado con el vigor de la planta.

#### IV.4.1.2. Análisis con marcadores moleculares

El análisis con RAPDs de plantas de olivo regeneradas mediante embriogénesis somática mostró diferencias claras entre las ocho líneas estudiadas, debido al origen de cada línea, a partir de semillas distintas. En total se obtuvieron 118 marcadores, de los que el 29,70% fueron monomórficos para todas las muestras, incluyendo las plantas control.

Utilizando la misma técnica, Munthali *et al.* (1996) detectaron polimorfismo en somaclones de *Beta vulgaris*, con una frecuencia del 0,05%. Frecuencias similares se encontraron en esta misma especie usando isoenzimas y RFLPs (Sabir *et al.* 1992; Levall *et al.* 1994). Al-Zahim *et al.* (1999) detectaron con RAPDs polimorfismos con una frecuencia total del 0,63% en plantas de *Allium sativum* regeneradas vía embriogénesis somática a partir de callos cultivados durante tiempo prolongado. No obstante, otros investigadores describieron utilizando RAPDs la ausencia de polimorfismo en plantas de cebada regeneradas mediante cultivo de anteras (Devaux *et al.* 1993) o de *Picea mariana* (Isabel *et al.* 1993) y *Festuca pratensis* (Valle *et al.* 1993) obtenidas vía embriogénesis somática.

El número total de fragmentos registrados en la presente investigación (2819) es elevado en comparación con los 900 obtenidos por Isabel *et al.* (1993) cuando evaluaron la estabilidad genética de plantas de *Picea mariana* regeneradas mediante embriogénesis somática. En regenerantes de *Beta vulgaris* (Munthali *et al.* 1996), *Prunus persica* (Hashmi *et al.* 1997) y

*Populus deltoides* (Rani *et al.* 1995) se detectaron 3, 59 y 78 polimorfismos analizando un total de 5607, 4180 y 1702 bandas, respectivamente. En consecuencia, el número total de bandas registradas en este trabajo parece aceptable con respecto a otros estudios para evaluar la estabilidad genética de plantas de olivo regeneradas a partir de cultivos embriogénicos.

En olivo, las líneas embriogénicas mantenidas en cultivo durante 2 años presentaron mayor estabilidad genética que las mantenidas durante 8 años, las cuales presentaron en todos los casos estudiados al menos dos genotipos distintos. Como se apuntó anteriormente, el tiempo de cultivo es uno de los factores que determina la aparición de variación somaclonal, con un aumento de la frecuencia de variación al aumentar el tiempo en mantenimiento (Bennicci 1974; Lörz y Scowcroft 1983; Nehra *et al.* 1992; Bogani *et al.* 1996). No obstante, al igual que ocurre a nivel fenotípico, algunas líneas se ven más afectadas por los cambios que otras.

#### IV.4.2. Evaluación de la estabilidad genética de plantas crioconservadas

##### IV.4.2.1. Análisis fenotípico

El análisis fenotípico de las plantas regeneradas a partir de cultivos de la línea P5 puso de manifiesto la existencia de variaciones morfológicas en las plantas control y en las procedentes de cultivos crioconservados, con o sin tratamiento previo con sacarosa. Sin embargo, todas las malformaciones encontradas en este estudio habían sido previamente observadas en plantas somáticas de la línea P5 analizadas para determinar el efecto de la embriogénesis somática sobre la aparición de variación somaclonal. Además, las frecuencias de aparición de los caracteres variantes no fueron diferentes entre las plantas procedentes de los diferentes tratamientos. Estos resultados podrían poner de manifiesto que la crioconservación no afecta al fenotipo de las plantas de olivo obtenidas vía embriogénesis somática, pudiendo tener su origen las variaciones observadas en procesos relacionados con el cultivo *in vitro*. No obstante, la posible aparición de nuevos fenotipos variantes al avanzar el desarrollo de las plantas hace recomendable una evaluación de las mismas más a largo plazo.

Existe relativamente poca información sobre los efectos de la crioconservación sobre la estabilidad genética y conformidad agronómica del material vegetal (Engelmann 1997). En plantas de crisantemo obtenidas de la regeneración de ápices crioconservados se han observado alteraciones fenotípicas que afectaron al color de la flor (Fukai *et al.* 1994). Estos cambios fueron debidos probablemente a la regeneración de sectores particulares del callo formado después de la descongelación. Estos sectores se “seleccionaron” probablemente por su particular sensibilidad al proceso de crioconservación (Côte *et al.* 2000). En este caso, la etapa de congelación no pareció responsable de la variación somaclonal observada. De hecho, la información disponible indicó que las técnicas de crioconservación generalmente no son el origen de los procesos de variación somaclonal en plantas. Resultados obtenidos en banana a nivel de campo apoyan esta idea (Côte *et al.* 2000).

Plantas de fresa y mandioca regeneradas a partir de meristemos apicales congelados fueron fenotípicamente similares a las plantas control (Kantha *et al.* 1980; Bajaj 1983). Árboles de palma de aceite desarrollados a partir de embriones crioconservados mostraron un crecimiento vegetativo y floral comparable al de las plantas control (Engelmann 1991). También, plantas de *Prunus* regeneradas *in vitro* a partir de ápices crioconservados mostraron un crecimiento normal, dando lugar a plantas fieles al tipo (Helliot *et al.* 2002). Tampoco hubo diferencias en el desarrollo morfológico de plantas control y crioconservadas de caña de azúcar (Paulet *et al.* 1993), cebolla (Lakhanpaul *et al.* 1996), arroz (Al-Forkan *et al.* 2001), kiwi (Wu *et*

*al.* 2001), uva (Zhao *et al.* 2001), *Eucalyptus* (Blakesley y Kiernan 2001), *Coffea* (Dussert *et al.* 1997), *Dendrobium candidum* (Wang *et al.* 1998) y *Cosmos atrosanguineus* (Wilkinson *et al.* 1998).

En sus estudios sobre plantas de fresa micropropagadas y obtenidas a partir de ápices crioconservados por el método de vitrificación en gota, Pinker *et al.* (2009) obtuvieron porcentajes de plantas fuera de tipo dentro del rango previamente descrito para plantas micropropagadas de esta especie (Popescu *et al.* 1997; Boxus *et al.* 2000; Morozova 2002).

La evaluación biométrica de las plantas en relación a parámetros como la longitud del tallo principal, diámetro del tallo principal y número de brotes axilares, reveló la existencia de plantas con un patrón de crecimiento variante, tanto en el tratamiento control como en +NL.

Estudios biométricos examinando caracteres morfológicos, características agronómicas o descriptores del desarrollo vegetal en *Dioscorea floribunda*, caña de azúcar y banana no revelaron diferencias significativas entre las plantas control y las crioconservadas (Harding 2004). En patata, plantas de 98 variedades obtenidas después de la crioconservación no mostraron ninguna variación fenotípica significativa (Schafer-Menuhar *et al.* 1997). En otro estudio llevado a cabo en esta misma especie se encontró una variación considerable en la altura de plantas crioconservadas, pero se atribuyó a un efecto medioambiental (Harding 1997). Estudios sobre el rendimiento en campo de plantas de banana obtenidas a partir de células en suspensión crioconservadas (Côte *et al.* 2000) y de caña de azúcar procedentes de callos crioconservados (Martínez-Montero *et al.* 2002) no mostraron diferencias con las plantas control.

#### IV.4.2.2. Análisis con marcadores moleculares

El número total de marcadores registrados en esta investigación fue de 110, de los que 2,73% fueron polimórficos. En estudios previos llevados a cabo en plantas de crisantemo regeneradas a partir de ápices crioconservados usando protocolos de vitrificación y encapsulación-deshidratación encontraron un 5,57% de polimorfismo en 121 marcadores registrados (Martín *et al.* 2011).

Los marcadores RAPDs de las plantas control y crioconservadas, con o sin tratamiento previo con sacarosa fueron idénticos en número y tamaño, excepto dos bandas, amplificadas con los primers B7 y F3, que aparecieron en una planta control y otra pretratada y crioconservada y una banda, amplificada con el primer A11, que desapareció en dos plantas crioconservadas, una con pretratamiento y otra sin pretratamiento.

De acuerdo con Sánchez *et al.* (2008), los resultados obtenidos podrían indicar que la variación genética observada no se debe a los tratamientos crioprotectores previos a la inmersión en NL ni al proceso de congelación, sino que podría estar causada por el cultivo *in vitro*, antes del proceso de crioconservación (Dixit *et al.* 2003) o durante la recuperación del cultivo, después de la descongelación (De Verno *et al.* 1999; Dixit *et al.* 2003; Keller *et al.* 2008).

El análisis con RAPDs de callos crioconservados de *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*, *Citrus aurantium* y *Citrus paradisi* puso de manifiesto el mantenimiento de la estabilidad genética después del proceso de crioconservación (Hao *et al.* 2002). En *Pinus sylvestris* (Hággman *et al.* 1998) y *Picea glauca engelmanni complex* (Cyr *et al.* 1994), la crioconservación tampoco afectó a la estabilidad genética de los cultivos embriogénicos. Los resultados obtenidos utilizando esta técnica tampoco revelaron cambios genéticos en otras especies como *Prunus Ferlenain Plumina* (*Prunus besseyi* x padre desconocido) (Helliot *et al.*



2002), *Vitis vinifera* (Zhai *et al.* 2003), *Humulus lupulus* (Peredo *et al.* 2008) y *Pinus nigra* (Salaj *et al.* 2011).

No obstante, los distintos tipos de estrés a los que se someten las células y tejidos durante la crioconservación (deshidratación, alta presión osmótica, baja temperatura, etc.), pueden causar variación genética (Engelmann 2004; Hazubska-Przbyl *et al.* 2010). De hecho, se ha detectado variación genética en material crioconservado a nivel morfológico, bioquímico, cromosómico y molecular (Müller *et al.* 2007; Kaity *et al.* 2008; Sánchez *et al.* 2008; Zeng *et al.* 2010; Martín *et al.* 2011). De hecho, en *Chrysanthemum x morifolium*, Martín y González-Benito (2005) y Martín *et al.* (2011) encontraron variaciones genéticas después de la crioconservación.

Algunos autores como Vannini y Poli (1983) encontraron que, en algunas condiciones, el DMSO podía ser el origen de las alteraciones. En algunas especies como *Abies cephalonica* (Aronen *et al.* 1999), *Solanum tuberosum* (Harding 1997) y *Rubus grabowskii* (Castillo *et al.* 2010), el DMSO dio lugar a la aparición de daños y/o reordenamientos cromosómicos. Este efecto ha sido explicado generalmente por su influencia sobre la permeabilidad y funcionalidad de las membranas, la estabilidad térmica de la estructura de los cromosomas o la inhibición de la síntesis de ADN. Aunque la crioconservación no elimina el potencial mutagénico del DMSO, es posible que elimine gran parte de los cambios genéticos que causa (Aronen *et al.* 1999), pudiendo ser utilizado de forma eficiente en los protocolos de conservación en NL (Salaj *et al.* 2011). Los efectos perjudiciales de este compuesto podrían ser reducidos utilizando otros crioprotectores, como el polietilenglicol o la glucosa, o una combinación de ambos (Aronen *et al.* 1999).





## CONCLUSIONES



## V. CONCLUSIONES

A partir de este trabajo se han extraído las siguientes conclusiones:

1. El mantenimiento de cultivos embriogénicos de olivo durante un periodo prolongado de tiempo (8 años) provocó un aumento de la tasa de multiplicación y un cambio en el patrón de proliferación, con una disminución de la producción de ES en estadios avanzados de desarrollo.

2. El tiempo de cultivo afectó de forma negativa al desarrollo de ES en medio de maduración y disminuyó la capacidad de germinación de los embriones formados, lo que provocó un descenso significativo del potencial de regeneración. Aunque los ES obtenidos a partir de los cultivos mantenidos durante más tiempo dieron lugar a más brotes por ES germinado, las plántulas obtenidas fueron más pequeñas. Las plantas regeneradas a partir de cultivos mantenidos en medio de proliferación durante diferentes periodos de tiempo no presentaron diferencias significativas en su comportamiento en las fases de multiplicación, enraizamiento y aclimatación; aunque los tallos procedentes de las líneas embriogénicas más jóvenes dieron lugar a brotes axilares de mayor longitud durante la fase de elongación.

3. La técnica de vitrificación en gota sobre tiras de aluminio se mostró adecuada para crioconservar ES de olivo, estableciéndose el tiempo de incubación en PVS2 en 30 min.

4. La tasa de recuperación de los cultivos después de la crioconservación se vio significativamente afectada por el método de cultivo, en medio líquido o medio sólido, la fase de crecimiento del cultivo y la interacción entre ambos factores. En general, las tasas de recuperación más elevadas se consiguieron con explantos procedentes de cultivos en suspensión. La fase de crecimiento óptima para la crioconservación varió dependiendo del método de cultivo: mientras que en medio sólido los mejores resultados se obtuvieron con explantos en la fase lag, en medio líquido se consiguieron al final de la fase exponencial.

5. El precultivo en medio con alta concentración de sacarosa mejoró significativamente la recuperación de los cultivos después de la crioconservación. Los mejores resultados se obtuvieron con explantos incubados 7 días en medio ECO sólido suplementado con sacarosa 0,2 M, con un 100% de los cultivos recuperados seis semanas después de la descongelación.

6. La crioconservación no afectó negativamente a ninguna de las fases de la embriogénesis somática, a pesar de existir una importante influencia del genotipo. La inclusión del tratamiento con sacarosa óptimo tampoco tuvo una influencia negativa sobre ninguna de las etapas del proceso. De hecho, los cultivos crioconservados después del precultivo con sacarosa presentaron un potencial de regeneración significativamente más elevado que los cultivos control, no crioconservados. Las plantas regeneradas a partir de cultivos crioconservados, sin o con tratamiento previo con sacarosa, no presentaron diferencias con las plantas control durante las fases de elongación, enraizamiento y aclimatación.

7. La aplicabilidad del protocolo de crioconservación establecido se demostró en diez líneas embriogénicas de características diferentes. En algunos casos fue necesaria la inclusión de un pretratamiento con sacarosa para conseguir porcentajes de recuperación del cultivo aceptables. No obstante, aun se requiere optimización adicional para mejorar los resultados obtenidos en una de las líneas testadas.

8. El ensayo con FDA reveló dos patrones de tinción diferentes: una fluorescencia tenue y de amplia distribución que desaparecía poco después de la descongelación y una fluorescencia específica, cuya frecuencia normalmente aumentaba con el tiempo. Estos resultados nos llevan a proponer que solo cuando el estado metabólico de la célula es el definitivo, las determinaciones de viabilidad celular mediante FDA pueden ser consideradas fidedignas.

9. La comparación morfológica de plantas de olivo regeneradas vía embriogénesis

somática con plantas control procedentes de semilla permitió la identificación de 14 fenotipos variantes. Todos los parámetros evaluados (frecuencia de aparición de los fenotipos variantes, porcentaje de fenotipos variantes, porcentaje de plantas con fenotipos variantes y número de fenotipos variantes acumulados por planta) se vieron afectados de forma significativa por el genotipo y la edad del cultivo. El análisis biométrico puso de manifiesto variaciones en la forma de crecimiento de las plantas regeneradas. El análisis genético mediante marcadores RAPDs permitió detectar variación genética entre individuos procedentes de una misma línea embriogénica. Esta diversidad apareció en mayor grado en las plantas procedentes de cultivos mantenidos durante 8 años.

10. La crioconservación, sin o con tratamiento previo con sacarosa, no dio lugar a nuevos fenotipos variantes. Ninguno de los parámetros evaluados (frecuencia de aparición de los fenotipos variantes, porcentaje de fenotipos variantes, porcentaje de plantas con fenotipos variantes y número de fenotipos variantes acumulados por planta) se vio afectado de forma significativa por este proceso, ni por el precultivo con sacarosa. El análisis con marcadores RAPDs permitió detectar variación genética en plantas de olivo procedentes de cultivos crioconservados, sin o con tratamiento previo con sacarosa. El número de individuos que presentaron variaciones fue más elevado en los cultivos crioconservados después de un precultivo con sacarosa.

## BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA

- Acebedo MM, Lavee S, Liñan J, Troncoso A (1997) *In vitro* germination of embryos for speeding up seedling development in olive breeding programmes. *Sci Hortic-Amsterdam* 69:207-215
- Acevedo-Couthinho L (1956) Subsidio para o estudio cariológico de *Olea Europaea* L. *Gen Iber* 8:3-44
- Agarwal M, Shrivasta N, Padh H (2008) Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep* 27:617-631
- Aguilar ME, Engelmann F, Michaux-Ferriere N (1993) Cryopreservation of cell suspensions of *Citrus deliciosa* Tan. an histological study. *CryoLetters* 14:217-228
- Akhtar N (1997) Studies on induction of somatic embryogenesis and production of artificial seeds for micropropagation of a tropical fruit tree guava (*Psidium guajava* L.). Ph D Thesis, Banaras Hindu University, p 203
- Al-Forkan M, Anthony P, Davey MR, Power JB, Lowe KC (2001) Effects of *Erythroge*<sup>TM</sup> on post-thaw recovery of cryopreserved cell suspensions of indica rice (*Oryza sativa* L.). *CryoLetters* 22:367-374
- Althoff DM, Gitzendanner MA, Segraves KA (2007) The utility of amplified fragment length polymorphisms in phylogenetics: a comparison of homology within and between genomes. *Syst Biol* 56(3):477-484
- Altman A, Hasegawa PM (2012) Plant Biotechnology and Agriculture. Prospects for the 21<sup>st</sup> century. Academic press, London, p 579
- Alwee SS, Van Der Linden CG, Van Der Schoot J, De Folter S, Angenent GC, Cheah SC, Smulders MJM (2006) Characterization of oil palm MADS box genes in relation to the mantled flower abnormality. *Plant Cell Tiss Org Cult* 85:331-344
- Al-Zahim MA, Ford-Lloyd BV, Newbury HJ (1999) Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Rep* 18:473-477
- Anandarajah K, McKersie BD (1990a) Enhanced vigor of dry somatic embryos of *Medicago sativa* L. with increased sucrose. *Plant Sci* 71:261-266
- Anandarajah K, McKersie BD (1990b) Manipulating the desiccation tolerance and vigor of dry somatic embryos of *Medicago sativa* L. with sucrose, heat shock and abscisic acid. *Plant Cell Rep* 9:451-455
- Arnholdt-Schmitt B, Herterich S, Neumann KH (1995) Physiological aspects of genome variability in tissue culture. I. Growth phase-dependent differential DNA methylation of the carrot genome (*Daucus carota* L.) during primary culture. *Theor Appl Genet* 91:809-815
- Aronen TS, Krajnakova J, Häggman HM, Ryyänen LA (1999) Genetic fidelity of cryopreserved embryogenic cultures of open-pollinated *Abies cephalonica*. *Plant Sci* 142:163-172
- Arsel H, Cirik N (1994) A general overview of olive breeding in Turkey. *Olivae* 52:25-27
- Assy-Bah B, Engelmann F (1992) Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) and subsequent regeneration of plantlets. *CryoLetters* 13:17-126
- Asthana P, Jaiswal VS, Jaiswal U (2011) Micropropagation of *Sapindus trifoliatus* L. and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD analysis. *Acta Physiol Plant* 33:1821-1829
- Azimi M, O'Brien C, Ashmore S, Drew R (2005) Cryopreservation of papaya germplasm. *Acta Hortic* 692:43-50
- Bachiri Y, Gazeau C, Hansz J, Morisset C, Dereuddre J (1995) Successful cryopreservation of suspension cells by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Tiss Org Cult* 43:241-248
- Bailey MA, Boerma HR, Parrott WA (1993) Genotype effects on repetitive and plant regeneration of soybean. *In vitro Cell Dev PI* 29:102-108
- Bairu MW, Fennell CW, van Staden J (2006) The effect of plant growth regulators on



- somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. 'Zelig'). *Sci Hortic-Amsterdam* 108:347-351
- Bairu MW, Aremu AO, Van Staden J (2011) Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul* 63:147-173
- Bairu MW, Kane ME (2011) Physiological and developmental problems encountered by *in vitro* cultured plants. *Plant Growth Regul* 63:101-103
- Bajaj YPS (1983) Cassava plants from meristem cultures freeze-preserved for three years. *Field Crop Res* 7:161-167
- Bajaj YPS (1990) Somaclonal variation-origin, induction, cryopreservation, and implications in plant breeding. En: Bajaj YPS (ed), *Somaclonal Variation in Crop Improvement I*. Springer-Verlag, Berlin, pp 3-48
- Bajaj S, Rajam MV (1996) Polyamine accumulation and near loss of morphogenesis in long-term callus cultures of rice (restoration of plant regeneration by manipulation of cellular polyamine levels). *Plant Physiol* 112(3):1343-1348
- Baldoni L, Belaj A (2009) Olive. En: Vollmann J, Rajcan I (eds) *Oil Crops*. Springer, New York, pp 397-421
- Balyss MW (1980) Chromosomal variation in tissue culture. *Int Rev Cytol Suppl* 11A:113-144
- Bao ZH, Ma YF, Liu JF, Wang KJ, Zhang PF, Ni DX, Yang WQ (1980) The induction of plantlets from the hypocotyl of *Olea europaea* *in vitro*. *Acta Bot Sin* 22:96-97
- Baránek M, Křížan B, Ondrušíková E, Pidra M (2010) DNA-methylation changes in grapevine somaclones following *in vitro* culture and thermotherapy. *Plant Cell Tiss Org Cult* 101:11-22
- Bardakci F (2001) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turk J Biol* 25:185-196
- Barranco D, Fernandez-Escobar R, Rallo L (2008) *El cultivo del olivo*. Mundi-Prensa-Junta de Andalucía 6<sup>º</sup> ed, Madrid, p 846
- Bartolini G, Leva AR, Benelli A (1990) Advances on *in vitro* culture of the olive propagation of cv. Maurino. *Acta Hortic* 286:41-44
- Bartolini G, Petruccelli R, Tindall HD, Menini UG (2002) Classification, origin, diffusion and history of the olive. *FAO*, Rome, p 74
- Bartolini S, Guerriero R (1995) Self-compatibility in several clones of oil olive cv. Leccino. *Adv Hortic Sci* 9:71-74
- Bebeli P, Karp A, Kaltsikes PJ (1988) Plant regeneration from cultured immature embryos of sister lines of rye and triticale differing in their content of heterochromatin. I. Morphogenetic response. *Theor Appl Genet* 75:929-936
- Becwar MR, Noland TL, Wann SR (1987) A method for quantification of the level of somatic embryogenesis among Norway spruce callus lines. *Plant Cell Rep* 6:35-38
- Belaj A, Trujillo I, De la Rosa R, Rallo L (1999) Marcadores de ADN para la identificación de variedades de olivo. *Agricultura* 799:166-167
- Belaj A, Trujillo I, De la Rosa R, Rallo L, Gimenez MJ (2001) Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *J Am Soc Hortic Sci* 126(1):64-71
- Belaj A, Satoviae Z, Cipriani G, Baldoni L, Testolin R, Rallo L, Trujillo I (2003) Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and their effectiveness in establishing genetic relationship in olive. *Theor Appl Genet* 107:736-744
- Belaj A, Satovic Z, Trujillo I, Rallo L (2004a) Genetic relationships of Spanish olive cultivars using RAPD markers. *Hortic Sci* 39:948-951
- Belaj A, Cipriani G, Testolin R, Rallo L, Trujillo I (2004b) Characterization and identification of the main Spanish and Italian olive cultivars by simple-sequence-repeat markers. *Hortic Sci* 39:1557-1561
- Bellini E (1990) Behaviour of some genetical characters in olive seedlings obtained by cross-

- breeding. En: Proceedings of 23<sup>rd</sup> international horticulture congress. Florence
- Bellini E (1993) Variabilidad genética y heredabilidad de algunos caracteres en las plantas de semillas de olivo obtenidas por cruzamiento. *Olivae* 49: 21-34
- Bellini E, Giordani E, Parlati MV, Pandolfi S (2002) Olive genetic improvement: Thirty years of research. *Acta Hort* 586:105-108
- Benelli C, De Carlo A, Lambardi M, Lynch PT (2001) Vitrification of shoot tips, nodal segments and embryogenic tissue of olive (*Olea europaea* L.) for germplasm cryopreservation. *Acta Hort* 560:137-140
- Bennicci A (1974) Cytological analysis of roots, shoots and plant regenerated from suspension and solid, *in vitro* cultures of haploid pelargonium. *Z Pflanzenzucht* 72:199-205
- Bennicci A, Anzidei M, Vendramin GG (2004) Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. Regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. *Plant Sci* 166:221-227
- Benson EE, Lynch PT, Jones J (1995) The use of the iron chelating agent desferrioxamine in rice cell cryopreservation: a novel approach for improving recovery. *Plant Sci* 110:249-258
- Benson EE (1999) Cryopreservation. En: Benson EE (ed) *Plant Conservation Biotechnology*. Taylor and Frances, London, pp 83-107
- Benson EE (2008) Cryopreservation theory. En: Reed BM (ed) *Plant Cryopreservation. A Practical Guide*. Springer, Nueva York, pp 15-32
- Benzekri H (2008) Embriogénesis somática de olivo. Thesis Master of Science, CIHEAM, IAMZ, Zaragoza
- Benzekri H, Sánchez-Romero C (2012) Maturation of olive somatic embryos. *Acta Hort* 961:441-447
- Benzion B, Phillips RL (1988) Cytogenetic stability of maize tissue cultures: a cell line pedigree analysis. *Genome* 30:318-325
- Berjak P, Farrant JM, BhatiaMycock DJ, Pammenter NW (1989) Homoiohydrous (recalcitrant) seeds: the enigma of their desiccation sensitivity and the state of water in axes of *Landolphia kirkii* Dyer. *Planta* 186:249-261
- Bewley JD, Black M (1985) Seeds: germination, structure and composition. En: Bewley JD, Black M (eds) *Physiology of Development and Germination*. Plenum Press, New York, pp 1-10
- Bhatia R, Singh KP, Sharma TR, Jhang T (2011) Evaluation of the genetic fidelity of *in vitro* propagated gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) using DNA-based markers. *Plant Cell Tiss Org Cult* 104:131-135
- Bhatti MH, Percival T, Davey CDM, Henshaw GG, Blakesley D (1997) Cryopreservation of embryogenic tissue of a range of genotypes of sweet potato using an encapsulation protocol. *Plant Cell Rep* 16:802-806
- Bhojwani SS, Razdan MK (1996) Somatic embryogenesis. En: Bhojwani SS, Razdan MK (eds), *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Elsevier, Amsterdam, pp 125-166
- Bitonti MB, Cozza R, Chiappetta A, Contento A, Minelli S, Ceccarelli M, Gelati M, Maggini F, Baldoni L, Cionini PG (1999) Amount and organization of the heterochromatin in *Olea europaea* and related species. *Heredity* 83:188-195
- Blakesley D, Kiernan RJ (2001) Cryopreservation of axillary buds of a *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus camaldulensis* hybrid. *CryoLetters* 22:13-18
- Bonga JM, Klimaszewska KK, von Aderkas P (2010) Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifer. *Plant Cell Tiss Org Cult* 100:241-254
- Bogani P, Cavalieri D, Petruccelli R, Polsinelli L, Roselli G (1994) Identification of olive tree by using random amplified polymorphic DNA. *Acta Hort* 356:98-101
- Bogani P, Simoni A, Lio P, Scialpi A, Buiatti M (1996) Genome flux in tomato cell clones cultured *in vitro* in different physiological equilibria. II. A RAPD analysis of variability. *Genome*

39:846-853

- Bogdanova ED (2003) Epigenetic variation induced in *Triticum aestivum* L. by nicotinic acid. Russ J Genet+ 39:1029-1034
- Bouharmont J (1994) Application of somaclonal variation and *in vitro* selection to plant improvement. Acta Hort 355:213-218
- Boxus P, Jemmali A, Terzi JM, Arezki O (2000) Drift in genetic stability in micropropagation: The case of strawberry. Acta Hort 530:155-162
- Bozhkov PV, Filonova LH, von Arnold S (2002) A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. Biotechnol Bioeng 77:658-667
- Bracci T, Busconi M, Fogher C, Sebastiani L (2011) Molecular studies in olive (*Olea europaea* L.): overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis. Plant Cell Rep 30:449-462
- Brar DS, Jain SM (1998) Somaclonal variation: mechanism and application in crop improvement. En: Jain SM, Brar DS, Ahloowalia BS (eds) Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 15-37
- Braun AC (1959) A demonstration of the recovery of the crown-gall tumor cell with the use of complex tumors of single-cell origin. Proc Natl Acad Sci USA 45:932-938
- Bregitzer P, Halbert SE, Lemaux PG (1998) Somaclonal variation in the progeny of transgenic barley. Theor Appl Genet 96:421-425
- Breton D, Harvengt L, Trontin JF, Bouvet A, Favre JM (2005) High subculture frequency, maltose-based and hormone-free medium sustained early development of somatic embryos in maritime pine. In vitro Cell Dev Pl 41:494-504
- Breton D, Harvengt L, Trontin JF, Bouvet A, Favre JM (2006) Long-term subculture randomly affects morphology and subsequent maturation of early somatic embryos in maritime pine. Plant Cell Tiss Org Cult 87: 95-108
- Brettell RIS, Dennis ES (1991) Reactivation of a silent Ac following tissue culture is associated with heritable alterations in its methylation pattern. Mol Gen Genet 229:365-372
- Briccoli-Bati C, Fodale A, Mule R, Trombino T (1999) Trials to increase *in vitro* rooting of *Olea europaea* L. cuttings. Acta Hort 474:91-94
- Bueno MA, Pintos B, Martin A (2006) Induction of embryogenesis via isolated microspore culture in *Olea europaea* L. En: Proceedings of 2<sup>nd</sup> international seminar on biotechnology and quality of olive tree products around the Mediterranean basin. Marsala, Italy, pp 19-26
- Burchett S, Niven S, Fuller MP (2006) The effect of cold-acclimation on the water relations and freezing tolerance of *Hordeum vulgare* L. CryoLetters 27:295-303
- Burg K, Hristoforoglu K, Fluch S, Hohl K, Burg A, Schmidt J (1999) Analysis of the fidelity of DNA replication in embryogenic cultures of Norway spruce. En: Espinel S, Ritter E (eds) Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99, Vitoria-Gasteiz, Spain, pp 231-236
- Burg K, Helmerson A, Bozhkov P, von Arnold S (2007) Developmental and genetic variation in nuclear microsatellite stability during somatic embryogenesis in pine. J Exp Bot 58:687-698
- Cañas LA, Wyssmann AM, Benbadis MC (1987) Isolation, culture and division of olive (*Olea europaea* L) protoplasts. Plant Cell Rep 5:369-371
- Cañas LA, Benbadis A (1988) *In vitro* regeneration from cotyledon fragments of the olive tree (*Olea europaea* L.). Plant Sci 54:65-74
- Capelo AM, Silva S, Brito G, Santos C (2010) Somatic embryogenesis induction in leaves and petioles of a mature wild olive. Plant Cell Tiss Org Cult 103:237-242
- Carboni E (2000) Adventitious shoot regeneration in Woody fruit species. En: Developmental

- biology of regeneration, 1<sup>st</sup> meeting, Geisenheim, Germany, pp 64-65
- Carver BF, Johnson BB (1989) Partitioning of variation derived from tissue culture of winter wheat. *Theor Appl Genet* 78:405-410
- Cassells AC, Morrish FM (1987) Variation in adventitious regenerants of *Begonia-rex* Putz. Lucille Closon as a consequence of cell ontogeny callus ageing and frequency of subculture. *Sci Hortic-Amsterdam* 32:135-144
- Cassells AC, Joyce SM, Curry RF, McCarthy TF (1999) Detection of economically important variability in micropropagation. En: Altman A, Ziv M, Izhar S (eds) *Plant Biotechnology and In vitro Biology in the 21<sup>st</sup> Century*. Kluwer Academic publishers, The Netherlands, pp 241-244
- Castillo NRF, Bassil NV, Wada S, Reed BM (2010) Genetic stability of cryopreserved shoot tips of *Rubus* germplasm. *In Vitro Cell Dev PI* 46:246-256
- Cerezo S, Mercado JA, Pliego-Alfaro F (2011) An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in olive. *Plant Cell Tiss Org Cult* 106:337-344
- Chaleff RS, Ray TB (1984) Herbicide resistant mutants from tobacco cell cultures. *Science* 223:1148-1151
- Charoensub R, Phansiri S, Sakai A, Yongmenitchai W (1999) Cryopreservation of cassava *in vitro* grown shoot tips cooled to -196°C by vitrification. *CryoLetters* 20:89-94
- Chawdhury MKU, Vasil V, Vasil IK (1994) Molecular analysis of plants regenerated from embryogenic cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 87:821-828
- Chen J, Henny RJ, Chao TC (2003) Somaclonal variation as a source for cultivar development of ornamental aroids. En: Pandalai SG (ed) *Recent Research Developmant in Plant Science*, vol 1. Research Signpost, Kerala, 1:31-43
- Chen XL, Li JH, Xin X, Zhang ZE, Xin PP, Lu XX (2011) Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. *S Afr J Bot* 77:397-403
- Chmielarz P, Grenier-de March G, de Boucaud MT (2005) Cryopreservation of *Quercus robur* L. embryogenic calli. *CryoLetters* 26:349-355
- Clark SE, Running MP, Meyerowitz EM (1993) CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* 119:397-418
- Clavero-Ramírez I (1994) Acortamiento del periodo juvenil en olivo (*Olea europaea* L.). I. Cultivo *in vitro* de embriones, II. Efecto del fotoperiodo en el crecimiento de plántulas. Tesis Doctoral, Universidad de Málaga
- Cloutier S, Landry B (1994) Molecular markers applied to plant tissue culture. *In Vitro Cell Dev PI* 30:32-39
- Corredoira E, San-José MC, Ballester a, Vieitez AM (2004) Cryopreservation of zygotic embryo axes and somatic embryos of European chestnut. *CryoLetters* 25:33-42
- Corley RHV, Lee CH, Law IH, Wang CY (1986) Abnormal flower development in oil palm clones. *Planter KL* 62:233-240
- Côte FX, Goue O, Domergue R, Panis B, Jenny C (2000) In-field behaviour of banana plants (*Musa AA* sp.) obtained after regeneration of cryopreserved embryogenic cell suspensions. *CryoLetters* 21:19-24
- Côte F, Teisson C, Perrier X (2001) Somaclonal variation rate evolution in plant tissue culture: contribution to understanding through a statistical approach. *In Vitro Cell Dev PI* 37:539-542
- Cresti M, Linskens HF, Mulclay DL, Bush S, Di Stilio V, My X, Vignani R, Cimato A (1997) Preliminary communication about the identification of DNA in leaves and in olive oil of *Olea europaea*. *Olivae* 69:36-37
- Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Aurell-Wistrom C (1984) Stabilisation of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Plant Cell Rep* 12:89-94
- Cullis CA (1992) The molecular biology of plant cells and cultures. En: Fowler MW, Warren GS



- (eds) Plant Biotechnology. Comprehensive Biotechnology, Second Supplement. Oxford, Pergamon, pp 19-32
- Cvikrová M, Meravy L, Machackova L, Eder J (1991) Phenyl alanine Ammonia-lyase, phenolic acids and ethylene in alfalfa (*Medicago sativa*) cell cultures in relation to their embryogenic ability. *Plant Cell Rep* 10:251-255
- Cyr DR, Lazaroff WRL, Grimes SMA, Quan G, Bethume TD, Dunstan DI, Roberts DR (1994) Cryopreservation of interior spruce (*Picea glauca engelmanni* complex) embryogenic cultures. *Plant Cell Rep* 13:574-577
- Dahleen LS, Stuthman DD, Rines HW (1991) Agronomic trait variation in oat lines derived from tissue culture. *Crop Sci* 31:90-94
- D'Amato F (1985) Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerants. *Crit Rev Plant Sci* 3:73-112
- D'Angeli S, Altamura MM (2007) Osmotin induces cold protection in olive trees by affecting programmed cell death and cytoskeleton organization. *Planta* 225:1147-1163
- Danso KE, Ford-Lloyd BV (2004) Cryopreservation of embryogenic calli of cassava using sucrose cryoprotection and air desiccation. *Plant Cell Rep* 22:623-631
- De la Rosa R, Angiolillo A, Rallo L, Guerrero C, Pellegrini M, Besnard G, Berville A, Martin A, Baldoni L (2003) A first genetic linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD and AFLP markers. *Theor Appl Genet* 106:1273-1282
- Deng R, Donnelly DJ (1993) *In vitro* hardening of red raspberry by CO<sub>2</sub> enrichment and reduced medium sucrose concentration. *Hortic Sci* 28:1048-1051
- Denton IR, Westcott RJ, Ford-Lloyd BV (1977) Phenotypic variation of *Solanum tuberosum* L. cv. Dr. McIntosh regenerated directly from shoot tip culture. *Potato Res* 20:131-136
- Dereuddre J, Fabre J, Bassaglia C (1988) Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. var. Eolo) apical and axillary shoot tips excised from different aged *in vitro* plantlets. *Plant Cell Rep* 7:170-173
- Dereuddre J, Blandin S, Hassen N (1991) Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to dessication and freezing in liquid nitrogen. I. Effects of preculture. *CryoLetters* 12:125-134
- Devaux P, Kilian A, Kleinhofs A (1993) Anther culture and *Hordeum bulbosum* derived barley doubled haploids: mutations and methylation. *Mol Gen Genet* 241:674-679
- De Verno LL, Park YS, Bonga JM, Barret JD (1999) Somaclonal variation in cryopreserved embryogenic clones of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss). *Plant cell Rep* 18:948-953
- De Vries SC, Booij H, Meyerkink P, Huisman G, Wilde DH, Thomas TL, Van Kammen A (1988) Acquisition of embryogenic potencial in carrot cell-suspension culture. *Planta* 176:196-204
- Diettrich D, Mertinal H, Luckner M (1992) Reduction of water loss during *ex vitro* acclimatization of micropropagated *Digitalis lanata* clone plants. *Biochem Physiol Pfl* 188:23-31
- Dixit S, Mandal BB, Ahuja S, Srivastava PS (2003) Genetic stability assessment of plants regenerated from cryopreserved embryogenic tissues of *Dioscorea bulbifera* L. using RAPD, biochemical and morphological analysis. *CryoLetters* 24:77-84
- Doležel J (1997) Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *J Appl Genet* 38:285-302
- Doležel J, Valárik M, Vrána J, Lysák MA, Hřibová E, Bartoš J, Gasmanová N, Doleželová M, Šafář J, Šimková H (2004) Molecular cytogenetics and cytometry of bananas (*Musa* spp.). En: Proceedings of meeting held in Leuven, Belgium, pp 219-227
- Doležel J, Bartoš JAN (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann Bot-London* 95:99-110
- Domínguez-García MC (2012) Marcadores moleculares de ADN: análisis de la variabilidad, relaciones genéticas y mapeo en olivo (*Olea europaea* L.). Tesis doctoral, Universidad de

Córdoba

- Domínguez-García MC, Belaj A, De la Rosa R, Satovic Z, Heller-Uszynska H, Kilian A, Martín A, Atienza SG (2012) Development of DArT markers in olive (*Olea europaea* L.) and usefulness in variability studies and genome mapping. *Sci Hortic-Amsterdam* 136:50-60
- Donn G, Tischler E, Smith J, Goodman H (1984) Herbicide resistant alfalfa cells: an example of gene amplification in plants. *J Mol Appl Genet* 2:621-635
- Doveri S, Gil FS, Díaz A, Reale S, Busconi M, Câmara Machado DA, Martín A, Fogher C, Donini P, Lee D (2008) Standardization of a set of microsatellite markers for use in cultivar identification studies in olive (*Olea europaea* L.). *Sci Hortic-Amsterdam* 116:367-373
- Driver JA, Kuniyuki AH (1984) *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. *Hortic Sci* 19:507-509
- Dumet D, Engelmann F, Duval Y (1992) Use of standard somatic embryos for the cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) cultures. En: Proc. XIII<sup>th</sup> Eucarpia Cong, Reproductive Biology and Plant Breeding. Angers, France, pp 413-414
- Dumet D, Engelmann F, Chabrillange N, Duval Y (1993a) Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a dessiccation step. *Plant cell Rep* 12:352-355
- Dumet D, Engelmann F, Chabrillange N, Duval Y, Derreuddre J (1993b) Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. *CryoLetters* 14:243-250
- Dumet D, Engelmann F, Chabrillange N, Duval Y (1994) Effect of dessiccation and storage temperature on the conservation of cultures of oil palm somatic embryos. *CryoLetters* 15:85-90
- Duncan RR (1997) Tissue culture-induced variation in crop improvement. *Adv Agron* 58:201-240
- Duran V (1991) Etudes de diverses phases de l'embryogenèse somatique et de la crioconservation chez *Picea abies* (L) Karst. Influence du génotype. Thèse Master, Université Catholique de Louvain
- Dussert S, Mauro MC, Deloire A, Hamon S, Engelmann F (1991) Cryopreservation of grape embryogenic cell suspensions: 1. Influence of pretreatment, freezing and thawing conditions. *CryoLetters* 12:287-298
- Dussert S, Mauro MC, Engelmann F (1992) Cryopreservation of grape embryogenic cell suspensions 2: Influence of post thaw culture conditions and application to different stains. *CryoLetters* 13:15-22
- Dussert S, Chabrillange N, Engelmann F, Anthony F, Hamon S (1997) Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: importance of the precooling temperature. *CryoLetters* 18:269-276
- Dussert S, Engelmann F, Noirot M (2003) Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections. *CryoLetters* 24:149-160
- Earle EB, Gracen VE (1985) Somaclonal variation in progeny of plants from corn tissue. En: Henke R, Hughes K, Holleander A (eds) Propagation of Higher Plants through Tissue Culture. Plenum Press, New York, pp 139-152
- Edallo S, Zucchini C, Perenzin M, Salamini F (1981) Chromosomal variation and plant regeneration in maize. *Maydica* 26:39-56
- El Aabidine A, Charafi J, Grout C, Doligez A, Santoni S, Moukhli A, Jay-Allemand C, Cherkaoui El Modafar C, Khadari B (2010) Construction of a Genetic Linkage Map for the Olive Based on AFLP and SSR Markers. *Crop Sci* 50(6):2291-2302
- El-DougDoug KA, El-Harhi HMS, Korkar HM, Taha RM (2007) Detection of somaclonal variation in banana tissue culture using isozyme and DNA fingerprint analysis. *J Appl Sci Res* 3:622-627

- Eeuwens CJ, Lord S, Donough CR, Rao V, Vallejo G, Nelson S (2002) Effect of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of 'mantled' flowering in clonally propagated oil palm. *Plant Cell Tiss Org Cult* 70:311-323
- Egertsdotter U, von Arnold S (1998) Development of somatic embryos in *Norway spruce*. *J Exp Bot* 49(319):155-162
- Etienne H, Bertrand B (2001) Trueness-to-type and agronomic characteristics of *Coffea arabica* trees micropropagated by the embryogenic cell suspension technique. *Tree Physiol* 21:1031-1038
- Etienne H, Bertrand B (2003) Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. *Tree Physiol* 23:419-426
- Emershad RL, Ramming DW (1994) Effects of media on embryo enlargement, germination and plant development in early-ripening genotypes of *Prunus* grown *in vitro*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 37:55-59
- Emons AMC, Vos JW, Kieft H (1992) A freeze fracture analysis of the surface of embryogenic and non-embryogenic suspension cells of *Daucus carota*. *Plant Sci* 87:85-97
- Emons AMC (1994) Somatic embryogenesis: cell biological aspects. *Acta Bot Neerl* 43:1-14
- Engelmann F (1991) *In vitro* conservation of tropical plant germplasm-a review. *Euphytica* 57:227-243
- Engelmann F (1992) Cryopreservation of embryos. En: Dattee Y, Dumas C, Gallais A (eds) *Reproductive Biology and Plant Breeding*. Springer-Verlag, Berlin, pp 281-290
- Engelmann F (1997) *In vitro* conservation methods. En: Ford-Lloyd BV, Newbury JH, Callow JA (eds) *Biotechnology and Plant Genetic Resources: conservation and use*. CABI, Wallingford, pp 119-162
- Engelmann F, Lartaud M, Chabrillange N, Carron MP, Etienne H (1997) Cryopreservation of embryogenic calluses of two commercial clones of *Hevea brasiliensis*. *CryoLetters* 18:107-116
- Engelmann F (2004) Plant cryopreservation: progress and prospects. *In vitro Cell Dev Pl* 40:427-433
- Engelmann F, Gonzalez-Arno MT, Wu Y, Escobar R (2008) Development of Encapsulation Dehydration. En: Reed BM (ed) *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer-Science, New York, pp 77-88
- Engelmann F (2011) Cryopreservation of embryos: an overview. En: Trevor A, Thorpe y Edward C. Yeung (eds) *Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol 710. Springer, New York, pp 155-184
- Evans DA, Bravo JE (1986) Phenotypic and genotypic stability of tissue cultured plants. En: Zimmerman RH, Griesbach RJ, Hammerschlag FA, Lawson RJ (eds) *Tissue Culture as a Plant Production System for Horticultural Crops*. Nijhoff, The Hague, pp 73-94
- Evans DA, Sharp WR, Flick CE (1981) Growth and behaviour of cell culture: embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe TA (ed) *Tissue Culture: Methods and Application in Agriculture*. Academy Press, New York, pp 45-113
- Evans DA, Sharp WR (1983) Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. *Science* 221:949-951
- Evans DA, Sharp WR, Medina-Filho AP (1984) Somaclonal variation and gametoclonal variation. *Am J Bot* 71:759-774
- Evans DA, Sharp WR (1986) Applications of somaclonal variation. *Nat Biotechnol* 4:528-532
- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT (1984) Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21:407-426
- Falisticco E, Tosti N (1996) Cytogenetic investigation in *Olea europaea* L. *J Genet Breed* 50:235-238



- Fang JY, Wetten A, Hadley P (2004) Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos for long-term germplasm storage. *Plant Sci* 166:669-675
- FAO (2012) FAOSTAT. disponible en el enlace <http://faostat.fao.org/>
- FAO (2013) FAOSTAT. disponible en el enlace <http://faostat.fao.org/>
- Fehér A (2005) Why somatic plant cells start to form embryos? En: Mujib A, Samaj J (eds) *Plant Cell Monogr. Somatic Embryogenesis*. Springer-Verlag, Berlin, pp 85-101
- Fernandes P, Rodríguez E, Pinto G, Roldán-Ruiz I, De Loose M, Santos C (2008) Cryopreservation of *Quercus suber* somatic embryos by encapsulation-dehydration and evaluation of genetic stability. *Tree Physiol* 28:1841-1850
- Figueiras Merino AM (2012) Mutación génica y reparación del ADN. En: Benito C, Espino FJ (eds) *Genética Conceptos Esenciales*. Panamericana, Madrid, p 587
- Filonova L, Bozhkov P, von Arnold S (2000) Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *J Exp Bot* 51:249-264
- Find JI, Kristensen MMH, Nørgaard JV, Krogstrup P (1998) Effect of culture period and cell density on regrowth following cryopreservation of embryogenic suspension cultures of Norway spruce and Sitka spruce. *Plant Cell Tiss Org Cult* 53:27-33
- Fiorino P, Leva AR (1986) Investigations on the micropropagation of the olive (*Olea europaea* L.), influence of some mineral elements on the proliferation and rooting of explants. *Olea* 17:101-104
- Fiuk A, Bednarek P, Rybczyński J (2010) Flow cytometry HPLC-RP and metaAFLP analyses to assess genetic variability in somatic embryo-derived plantlets of *Gentiana pannonica* Scop. *Plant Mol Biol Rep* 28:413-420
- Flachsland E, Terada G, Scocchi A, Rey H, Mroginski L, Engelmann F (2006) Cryopreservation of seeds and *in vitro*-cultured protocorms of *Oncidium bifolium sims.* (Orchidaceae) by encapsulation-dehydration. *CryoLetters* 27(4):235-242
- Fontanazza U, Baldoni L, Corona C (1990) Osservazioni preliminary sul valor agronomico di una nuova cultivar da olio: "Fs-17". En: *Proc Problematiche qualitative dell'olio d'oliva*. Accademia Nazionale dell'Olio. Spoleto, Italy, pp 69-75
- Fontanazza G (1993) *Olivicoltura Intensiva Meccanizzata*. Edagricole, Bologna, p 312
- Fontanazza G, Bartolozzi F (1998) Olive. En: Scarascia-Mugnozza GT, Pagnotta MA (eds) *Italian Contribution to Plant Genetics and Breeding*. University of Tuscia, Viterbo, pp 723-748
- Fontanazza G, Bartolozzi F, Vergari G (1998) Olivo Fs-17 Riv. *Frutticoltura* p (5):61
- Ford CS, Jones NB, Van Staden J (2000) Cryopreservation and plant regeneration from somatic embryos of *Pinus patula*. *Plant Cell Rep* 19:610-615
- Fourré J-L, Berger P, Niquet L, André P (1997) Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic and molecular approaches. *Theor Appl Genet* 94:159-169
- Friesen LJ, Kartha KK, Leung NL, Englund P, Giles KL, Park J (1991) Cryopreservation of *Papaver somniferum* cell suspension cultures. *Planta Med* 57:53-55
- Fujii JA, Slade D, Redenbaugh MK (1990) Method of plant somatic embryo production in tissue culture for planting in growth chamber, greenhouse or as a true seed, World Patent Applic
- Fukai S, Goi M, Tanaka M (1994) The chimeric structure of the apical dome of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam.) is affected by cryopreservation. *Sci Hortic-amsterdam* 57:347-351
- Fukui K (1983) Sequential occurrence of mutations in a growing rice callus. *Theor Appl Genet* 65:225-230
- Gagliardi RF, Pacheco GP, Carneiro LA, Valls JFM, Vieira MLC, Mansur E (2003) Cryopreservation of *Arachis* species by vitrification of *in vitro*-grown shoot apices and genetic stability of recovered plants. *CryoLetters* 24:103-10

- Gahan PB, George EF (2008) Adventitious regeneration. En: George EF, Hall MA, Klerk GJ (eds) Plant Propagation by Tissue Culture 3<sup>rd</sup> Edition. Springer, Dordrecht, pp 355-401
- Gale S, John A, Benson EE (2007) Cryopreservation of *Picea sitchensis* (Stika spruce) embryogenic suspensor masses. CryoLetters 28:225-239
- García-Férriz L, Ghorbel R, Ybarra M, Marí A, Belaj A, Trujillo I (2002) Micropropagation from adult olive trees. Acta Hort 586:879-882
- Gawel NJ, Jarret RL (1991) A modified CTAB DNA Extraction Procedure for *Musa* and *Ipomoea*. Plant Mol Biol Rep 9(3):262-266
- Gemas VJ, Rijo-Johansen MJ, Tenreiro R, Feveireiro P (2000) Inter and intra-varietal analysis of three *Olea europaea* L. cultivars using RAPD techniques. J Hort Sci Biotech 75:312-319
- Giménez C, de García E, de Enrech NX, Blanca I (2001) Somaclonal variation in banana: cytogenetic and molecular characterization of the somaclonal variant CIEN BTA-03. In Vitro Cell Dev PI 37:217-222
- Godsen J, Hanratty D, Starling J, Fantes J, Porteous D (1991) Oligonucleotides primed *in situ* DNA synthesis (PRINS): a method for chromosome mapping, banding and investigation of sequence organization. Cytogenet Cell Genet 57:100-104
- González-Arno MT, Moreira T, Urra C (1996) Importance of pregrowth with sucrose and vitrification for the cryopreservation of sugarcane apices using encapsulation-dehydration. CryoLetters 17:141-148
- González-Arno MT, Engelmann F, Urra C, Morenza M, Rios A (1998) Cryopreservation of citrus apices using the encapsulation-dehydration technique. Cryoletters 19:117-182
- González-Arno MT, Engelmann F (2006) Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. CryoLetters 27:155-168
- González-Arno MT, Panta A, Roca WM, Escobar RH, Engelmann F (2008) Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. Plant Cell Tiss Org Cult 92:1-13
- González-Arno MT, Lazaro-Vallejo CE, Valencia MG, Ortiz Patraca NM, Texcahua Martínez H (2010) Adjustment of cryoprotective conditions for vanilla (*Vanilla planifolia*) shoot tips subjected to a droplet vitrification protocol. Cryobiology 61:362-408
- González-Benito ME, Martín C, Iriondo JM, Pérez C (1999) Conservation of the rare and endangered plants endemic to Spain. En: Benson EE (ed) Plant Conservation Biotechnology. Taylor & Francis, London, pp 251-264
- Gould AR (1984) Control of the cell cycle in cultured plant cells. Crit Rev Plant Sci 1:315-344
- Grandbastien MA, Spielmann A, Caboche M (1989) Tnt1, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant-cell genetics. Nature 337:376-380
- Grandbastien MA (1998) Activation of plant retrotransposons under stress conditions. Trends Plant Sci 3:181-187
- Green PS (2002) A revision of *Olea* L. (Oleaceae). Kew Bulletin Springer, Royal Botanic Gardens, 57(1):91-140
- Grenier-de-March G, Boucaud MT, Chmielarz P (2005) Cryopreservation of *Prunus avium* L. embryogenic tissues. CryoLetters 26:341-348
- Griggs WH, Hartmann HT, Bradley MV, Iwaraki BT, Whisler JE (1975) Olive pollination in California. Calif AES Bull 869:1-50
- Grout BWW, Millam S (1985) Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. Ann Bot-London 55:129-131
- Guerin JR, Sweeney SM, Collins GG, Sedgley M (2002) The development of a genetic database to identify olive cultivars. J Am Soc Hort Sci 127:177-213
- Gupta PK, Pullman G, Timmis R, Kreitingner M, Carlson W, Grob J, Welty E (1993) Forestry in the 21<sup>st</sup> century: The biotechnology of somatic embryogenesis. Biotechnol 11:454-459

- Guzmán-García E (2012) Avocado somatic embryogenesis: maturation and germination of somatic embryos, characterization and cryopreservation of embryogenic cultures. PhD Dissertation, Universidad de Córdoba
- Guzmán-García E, Bradaï F, Sánchez-Romero C (2013) Cryopreservation of avocado embryogenic cultures using the droplet-vitrification method. *Acta Physiol Plant* 35:183-193
- IBPGR (1977) Report of the second meeting of the Advisory Committee of IBPGR on the Genetic Resources Communication, Information and Documentation System (GR/CIDS). FAO, Rome
- Isabel N, Tremblay L, Michaud M, Tremblay FM, Bousquet J (1993) RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana* (Mill.). *Theor Appl Genet* 86:81-87
- Isabel N, Boivin R, Lavasseur C, Charles PM, Bousquet J, Tremblay FM (1996) Occurrence of somaclonal variation among somatic embryo-derived white spruces (*Picea glauca*, Pinaceae). *Am J Bot* 83:1121-1130
- Ishikawa M, Suzuki M, Nakamura T, Kishimoto T, Robertson AJ, Gusta LV (2006) Effect of growth phase on survival of bromegrass suspensions cells following cryopreservation and abiotic stresses. *Ann Bot-London* 97:453-459
- Israeli Y, Reuveni O, Lahav E (1991) Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by *in vitro* techniques. *Sci Hortic-Amsterdam* 48:71-88
- Israeli Y, Lahav E, Reuveni O (1995) *In vitro* culture of bananas. En: Gowen S (ed) Bananas and plantains. Chapman and Hall, London, pp 147-178
- Jaccard P (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vaud Sci Nat* 44:223-270
- Jafarzadeh-Bajestani M, Khodai-Kalaki M, Motamed N, Noorayin O (2011) Genetic transformation of olive somatic embryos through *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants. *Afr J Biotechnol* 10:5461-5467
- Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (1995) Somatic Embryogenesis in Woody Plants, vol 2. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 17-33
- Jain SM (1997) Somaclonal variation and mutagenesis for crop improvement. En: Immomen (ed) Maatalouden Tutkimuskeskuksen Julkaisuja, vol 18. pp 122-133
- Jain SM, Brar DS, Ahloowalia BS (1998) Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 293-309
- Jain SM (2001) Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118:153-166
- Jain MS, Pramod KG, Ronald JN (2002) Somatic embryogenesis in woody plants. *Forestry Science Netherlands* 6:1-16
- Jaligot E, Beulé T, Rival A (2002) Methylation-sensitive RFLPs: characterisation of two oil palm markers showing somaclonal variation-associated polymorphism. *Theor Appl Genet* 104:1263-1269
- Jitsuyama Y, Suzuki T, Harada T, Fujikawa S (2002) Sucrose incubation increases freezing tolerance of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic cell suspensions. *CryoLetters* 23:103-112
- Johannes F, Porcher E, Teixeira FK, Saliba-Colombani V, Simon M, Agier N, Bulski A, Albuissou J, Heredia F, Audigier P, Bouchez D, Dillmann C, Guerche P, Hospital F, Colot V (2009) Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits. *PLoS Genet* 5:e1000530
- Jones LH, Hanke DE, Eeuwens CJ (1995) An evaluation of the role of cytokinins in the development of abnormal inflorescences in oil Palms (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerated from tissue culture. *J Plant Growth Regul* 14:135-142
- Jullien PE, Berger F (2010) DNA methylation reprogramming Turing plant sexual reproduction? *Trends Genet* 26:394-399

- Kaeppler SM, Phillips RL (1993a) DNA methylation and tissue culture-induced variation in plants. *In Vitro Cell Dev PI* 29:125-130
- Kaeppler SM, Phillips RL (1993b) Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8773-8776
- Kaeppler SM, Kaeppler HF, Rhee Y (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol Biol* 43:179-188
- Kaity A, Ashmore SE, Drew RA, Dullo ME (2008) Assessment of genetic and epigenetic changes following cryopreservation in papaya. *Plant Cell Rep* 27:1529-39
- Karp A (1989) Can genetic instability be controlled in plant tissue cultures? *Intl Assoc Plant Tiss cult Newslett* 58:2-11
- Karp A (1993) Are your plants normal? Genetic instability in regenerated and transgenic plants. *Agro-Food-Industry Hi-Tech* pp 7-12
- Karp A (1994) Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. En: Vasil IK, Thorpe TA (eds) *Plant Cell and Tissue Culture*. Kluwer Academic publishers, Dordrecht, pp 139-152
- Karp A (1995) Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* 85: 295-302.
- Kartha KK, Leung NL, Pahl K (1980) Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of shoots. *J Am Soc Hortic Sci* 105:481-484
- Kartha KK, Leung NL, Mroginski LA (1982) *In vitro* growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Z pflanzenphysiol* 107:133-140
- Kartha KK, Engelmann F (1994) Cryopreservation and germoplasm storage. En: Vasil IK, Thorpe TA (eds) *Plant cell and tissue culture*. Kluwer, Dordrecht, pp 195-230
- Kaviani B, Dahkaei M, Hashemabadi D, Darabi A (2010) Cryopreservation of *Lilium ledebourii* (Baker) Bioss. by encapsulation-vitrification and in vivo media for planting of germplasm. *American-Eurasian J Agric Environ Sci* 8(5):556-560
- Keller ERJ, Senula A, Kaczmarczyk A (2008) Cryopreservation of herbaceous dicots. En: Reed BM (ed) *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer, New York, pp 281-332
- Kendall EJ, Kartha KK, Qureshi JA, Chermak P (1993) Cryopreservation of immature spring wheat zygotic embryos using abscisic acid pretreatment. *Plant Cell Rep* 12:89-94
- Keyes GJ, Collins GB, Tayiw NL (1980) Genetic variation in tissue cultures of red clover. *Theor Appl Genet* 58:265-271
- Kim SI, Choi HK, Son JS, Yun JH, Jang MS, Kim HR (2001) Cryopreservation of *Taxus chilensis* suspensión cell cultures. *CryoLetters* 22:43-50
- Kiyosue T, Satoh S, Kamada H, Harada H (1993) Somatic embryogenesis in higher plants. *J Plant Res* 3:75-82
- Klimaszewska K, Noceda C, Pelletier G, Label P, Rodriguez R, Lelu-Walter M-A (2009) Biological characterization of young and aged embryogenic cultures of *Pinus pinaster* (Ait.). *In Vitro Cell Dev PI* 45:20-33
- Klug WS, Cummings MR, Spencer CA, Palladino MA (2013) *Conceptos de genética* 10ª Edition. Pearson, Spain, p 949
- Kochba J, Spiegel-Roy P, Safran H (1972) Adventive plants from ovules and nucelli in *Citrus*. *Planta* 106:237-245
- Komatsuda T, Ohyama K (1988) Genotype of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean *Glycine max*. *Theor Appl Genet* 75:695-700
- Komatsuda T, Lee W, Oka S (1992) Maturation and germination of somatic embryos as affected by sucrose and plant growth regulators in soybeans *Glycine gracilis* Skvortz and *Glycine max* (L.) Merr. *Plant Cell Tiss Org Cult* 28:103-113
- Konan KE, Durand-Gasselin T, Justin Kouadio Y, Flori A, Rival A, Duval Y, Pannetier C (2010) *In vitro* conservation of oil palm somatic embryos for 20 years on a hormone-free culture



- medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. *Plant Cell Rep* 29:1-13
- Konieczny R, Pilarska M, Tuleja M, Salaj T, Ilnicki T (2010) Somatic embryogenesis and plant regeneration in zygotic embryos of *Trifolium nigrescens* (Viv.). *Plant Cell Tiss Org Cult* 100:123-130
- Kour G, Kour B, Kaul S, Dhar MK (2009) Genetic and epigenetic instability of amplification-prone sequences of a novel B chromosome induced by tissue culture in *Plantago lagopus* L. *Plant Cell Rep* 28:1857-1867
- Kovacs EI (1985) Regulation of karyotype stability in tobacco tissue cultures of normal and tumorous genotypes. *Theor App Genet* 70:548-554
- Kramer PJ, Kozlowski TT (1979) Physiology of woody plants. Academic Press, New York, p 811
- Kulus D, Zalewska M (2014) Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species-A review. *Sci Hortic-Amsterdam* 168:88-107
- Kumar S, Mangal M, Dhawan AK, Singh N (2011) Assessment of genetic fidelity of micropropagated plants of *Simmondsia chilensis* (Link) Schneider using RAPD and ISSR markers. *Acta Physiol Plant* 33:2541-2545
- Kunitake H, Koreeda K, Mii M (1995) Morphological and cytological characteristics of protoplast-derived plants of statice (*Limonium perezii* Hubbard). *Sci Hortic-Amsterdam* 60:305-312
- Kuranuki Y, Sakai A (1995) Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of tea (*Camellia sinensis*) by vitrification. *CryoLetters* 16:345-352
- Häggmann HM, Ryyänen LA, Aronen TS, Krajnakova J (1998) Cryopreservation of embryogenic cultures of Scots pine. *Plant Cell Tiss Org Cult* 54:45-53
- Hajeer A, Worthington J, John S (2000) SNP and Microsatellite Genotyping: Markers for Genetic Analysis. *Biotechniques Molecular Laboratory Methods Series*. Eaton, Manchester,
- Hakim RI, Grati-Kammoun N, Makhloufi E, Rebaï A (2010) Discovery and potencial of SNP markers in characterization of Tunisian olive germplasm. *Diversity* 2:17-27
- Halmagyi A, Fischer-Klüver G, Mix-Wagner G, Schumacher M (2004) Cryopreservation of *Chrysanthemum morifolium* (*Dendranthema grandiflora* Ramat.) using different approaches. *Plant cell Rep* 22(6):371-375
- Halmagyi A, Deliu C, Coste A (2005) Plant regeneration from potato shoot tips cryopreserved by a combined vitrification-droplet method. *CryoLetters* 26:313-322
- Halmagyi A, Pinker I (2006) Plant regeneration from Rosa shoot tips cryopreserved by a combined droplet vitrification method. *Plant Cell Tiss Org Cult* 84:145-153
- Hammerschlag FA (1992) Somaclonal variation. En: Hammerschlag FA and Litz RE (eds), *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*. CAB International, Cambridge, pp 35-55
- Hao Y-J, Deng X-X (2002) Occurrence of chromosomal variations and plant regeneration from long-term cultured citrus callus. *In vitro Cell Dev PI* 38:472-476
- Harding K (1996) Approaches to assess the genetic stability of plants recovered from *in vitro* culture. En: Normah MN, Narimah MK, Clydee MM (Eds), *Proceeding of the International Workshop on In vitro Conservation of Plant Genetic Resources*. Plant Biotechnology Laboratory, University Kebangsaan, Malaysia, pp:137-170
- Harding K (1997) Stability of the ribosomal RNA genes in *Solanum tuberosum* L. plants recovered from cryopreservation. *CryoLetters* 18:217-230
- Harding K, Benson EE (2000) Analysis of nuclear and chloroplast DNA in plants regenerated from cryopreserved shoot-tips of potato. *CryoLetters* 21:279-288
- Harding K, Staines H (2001) Biometric analysis of phenotypic characters of potato shoot-tips recovered from tissue culture, dimethyl sulphoxide treatment and cryopreservation. *CryoLetters* 22:255-262
- Harding K (2004) Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. *CryoLetters* 25:3-22
- Hargreaves CL, Grace LJ, Holden DG (2002) Nurse culture for efficient recovery of

- cryopreserved *Pinus radiata* D. on embryogenic cell lines. *Plant Cell Rep* 21:40-45
- Hartmann C, Henry Y, de Buyser J, Aubry C, Rode A (1989) Identification of new mitochondrial genome organizations in wheat plants regenerated from somatic tissue cultures. *Theor Appl Genet* 77:169-175
- Hashmi G, Huettel R, Meyer R, Krusberg L, Hammerschlag F (1997) RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. *Plant Cell Rep* 16:624-627
- Hazubzca-Przybyl T, Chmielarz P, Michalak M, Bojarczuk K (2010) Cryopreservation of embryogenic tissues of *Picea omorica* (Serbian spruce). *Plant Cell Tiss Org Cult* 102:35-44
- Heine-Dobbernack E, Seufert S, Schumacher HM (2006) Controlled rate freezing of dedifferentiated plant cell lines a mini test system for quick evaluation of parameters. *Cryobiology* 53:367-446
- Heine-Dobbernack E, El Banna A, Kiesecker H, Schumacher HM (2007) Dedifferentiated plant cell lines for the evaluation of physiological parameters of cryotolerance. En: *Cryopreservation of Crop Species in Europe*. Eur Coop Sci Technol, Oviedo, pp 20-21
- Heine-Dobbernack E, Kiesecker H, Schumacher HM (2008) Cryopreservation of dedifferentiated cell cultures. En: Reed BM (ed) *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Business Media, New York, pp 141-176
- Helliot B, Madur D, Dirlwanger E, Bocaud MT (2002) Evaluation of genetic stability in cryopreserved *Prunus*. *In Vitro Cell Dev PI* 38:493-500
- Helliot B, Swennen R, Poumay Y, Frison E, Lepoivre P, Panis B (2003) Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa* spp.) highly proliferating meristems. *Plant Cell Rep* 21:690-698
- Henry Y, Marcotte J-L, de Buyser J (1996) The effects of aneuploidy on karyotype abnormalities in wheat plants regenerated from short and long term somatic embryogenesis. *Plant Sci* 114:101-109
- Hirochika H (1993) Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. *EMBO J* 12:2521-2528
- Hirochika H, Sugimoto K, Otsuki Y, Tsugawa H, Kanda M (1996) Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7783-7788
- Högberg KA, Bozhkov PV, von Arnold S (2003) Early selection improves clonal performance and reduces intraclonal variation of Norway spruce plants propagated by somatic embryogenesis. *Tree Physiol* 23:211-216
- Hossein AS, Hajnajari H (2006) Obtaining embryo rescued hybrid plants of olive (*Mary Roghani* M.) in cross breeding for precocity induction. En: *Proceedings of the second international seminar on biotechnology and quality of olive tree products around the Mediterranean basin*. Marsala, Italy, pp 27-29
- Hua YM, Hong SR (2010) A simple cryopreservation protocol of *Dioscorea bulbifera* L. embryogenic calli by encapsulation-vitrification. *Plant Cell Tiss Org Cult* 101:349-358
- Laine E, Bade P, David A (1992) Recovery of plants from cryopreserved embryogenic cell suspensions of *Pinus caribaea*. *Plant Cell Rep* 11:295-298
- Lakhanpaul S, Babrekar PP, Chandel KPS (1996) Monitoring studies in onion (*Allium cepa* L.) seeds retrieved from storage at -20°C and -180°C. *CryoLetters* 17:219-232
- Lambardi M, Amorosi S, Caricato G, Benelli C, Branca C, Rugini E (1999) Microprojectile-DNA delivery in somatic embryos of olive (*Olea europaea* L.). *Acta Hort* 474:505-509
- Lambardi M, De Carlo A, Benelli C, Bartolini G (2001) Cryopreservation of Woody species by vitrification of shoot tips and embryogenic tissue. *Acta Hort* 560:125-128
- Lambardi M, Ozudogru A, Benelli C (2008) Cryopreservation of embryogenic cultures. En: Reed BM (ed) *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Business Media, New York, pp 177-

- Lambe P, Mutambel HSN, Fouche JG, Deltour R, Foidart, Gaspar T (1997) DNA methylation as a key process in regulation of organogenic totipotency and plant neoplastic progression. *In vitro Cell Dev PI* 33:155-162
- Lapitan NLV, Sears RG, Gill BS (1988) Amplification of repeated DNA sequences in wheat x rye hybrids regenerated from tissue culture. *Theor Appl Genet* 75:381-388
- Lardet L, Martin F, Dessailly F, Carron MP, Montoro P (2007) Effect of exogenous calcium on post-thaw growth recovery and subsequent plant regeneration of cryopreserved embryogenic calli of *Hevea brasiliensis* (Müll Arg.). *Plant Cell Rep* 26:559-569
- Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor Appl Genet* 60:197-214
- Larkin PJ, Ryan SA, Brettell RIS, Scowcroft WR (1984) Heritable somaclonal variation in wheat. *Theor Appl Genet* 67:443-455
- Larkin PJ (1998) Introduction. En: Jain SM, Brar DS, Ahloowalia BS (eds) *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 3-13
- Lavee S, Datt Z (1978) The necessity of cross-pollination for fruit set of 'Manzanillo' olives. *J Hortic Sci* 53(4):261-266
- Lavee S, Harshemesh H, Haskal A, Meni V, Wodner M, Ogrodivitch O, Avidan B, Wiesman Z, Avidan N, Trapero-Casas A (1999) 'Maalot' un nuevo cultivar resistente al repilo en olivar (*Spilocaea oleagina* Cast.). *Olivae* 78:51-59
- Lavee S, Avidan B, Meni Y (2003) 'Askal', a new high-performing oil variety for intensive and super-intensive olive orchards. *Olivae* 97:53-59
- Lavee S, Avidan B, Meni V, Kaskala A, Wdner M (2004) Three new varieties of semi-dwarf table olives. *Olivae* 102:33-41
- Lecouteux C, Tessereau H, Florin B, Courtois D, Pétlard V (1992) Reservation of carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryos by dehydration after pretreatment with sucrose. *Comptes Rendus de l'académie des Sciences, Série III*. Paris, 314:423-428
- Lee ML, Phillips RL (1988) The chromosomal basis of somaclonal variation. *Ann Rev Plant Phys* 39:413-437
- Lee ML, Geadelan JL, Phillips RL (1988) Agronomic evaluation of inbred lines derived from tissue cultures of maize. *Theor Appl Genet* 75:841-849
- Leitao LF, Fevereiro OS (1998) Continuous somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of *Olea europaea* (cv. *Galena vulgar*). *Cost Action 822-824 Embryogenic Potential and Transformation of Gametic and Somatic Cells*. Dun Laoghaire, Dublin
- Leljak-Levanic D, Bauer N, Mihaljevic S, Jelaska S (2004) Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. *Plant Cell Rep* 23:120-127
- Lelu-Walter MA, Bernier-Cardou M, Klimaszewska K (2006) Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster*. *Plant Cell Rep* 25:767-776
- León L, Martín LM, Rallo L (2004) Phenotypic correlations among agronomic traits in olive progenies. *J Am Soc Hortic Sci* 129:271-276
- León L, De la Rosa R, Barranco D, Rallo L (2007) Breeding for Early Bearing in Olive. *Hortic Sci* 42(3):499-502
- León L, Arias-Calderón R, Bejarano-Alcázar J, Belaj A, De la Rosa R, Rodríguez-Jurado D (2013) Mejora de olivo para resistencia a la Verticilosis L. VII Congreso Ibérico de Agroingeniería y Ciencias Hortícolas, Madrid, pp 26-29
- Leprince AS, Grandbastien MA, Meyer C (2001) Retrotransposons of the Tnt1B family are mobile in *Nicotiana plumbaginifolia* and can induce alternative splicing of the host gene upon insertion. *Plant Mol Biol* 47:533-541
- Leva AR, Petruccelli R, Goretti R, Panicucci M (1992) Ruolo di alcuni microelementi e



- carboidrati nella proliferazione 'in vitro' di cv. di olivo (*Olea europaea* L.). Atti Conv 'Olive oil quality'. Firenze, pp 333-334
- Leva AR, Muelo R, Petrucelli R (1995) Long term somatic embryogenesis from immature olive cotyledons. *J Hortic Sci* 70:417-421
- Leva AR (2009) Morphological evaluation of olive plants propagated *in vitro* through axillary buds and somatic embryogenesis methods. *African Journal of Plant Science* 3(3):37-43
- Leva AR, Petrucelli R, Rinaldi LMR (2012) Somaclonal variation in tissue culture: a case study with olive. *INTECH* pp 123-150
- Levall MW, Bengtsson K, Nilsson NO, Hjerdin A, Hallden C (1994) Molecular characterization of UV treated sugar beet somaclones using RFLP markers. *Physiol Plantarum* 90:216-220
- Lin X, Long L, Shan X, Zhang S, Shen S, Liu B (2006) In planta mobilization of *mPing* and its putative autonomous element *Pong* in rice by hydrostatic pressurization. *J Exp Bot* 57:2313-2323
- Liphschitz N, Gophna R, Hartman M, Biger G (1991) The beginning of olive (*Olea europaea*) cultivation in the Old World: a reassessment. *J Archaeol Sci* 18:441-453
- Litz RE, Chavez VM, Moon PA, Bruns S, Mantell S, Tragardh C, Viana AM (1998) Induction of embryogenic cultures from immature-phase tropical and subtropical trees and control of somatic embryo maturation and germination. En: Brun S, Mantell S, Tragardh C (eds) *Recent Advances in Biotechnology for Tree Conservation and Management*, Proc IFS workshop Florianopolis Brazil, International Foundation of Science (IFS), Stockholm, Sweden, pp 232-243
- Liu B, Wendel JF (2000) Retrotransposon activation followed by rapid repression in introgressed rice plants. *Genome* 43:874-880
- Lopes T, Capelo A, Brito G, Loureiro J, Santos C (2009) Genetic variability analyses of the somatic embryogenesis induction process in *Olea* spp. using nuclear microsatellites. *Trees* 23:29-36
- López CMR, Wetten AC, Wilkinson MJ (2010) Progressive erosion of genetic and epigenetic variation in callus-derived cocoa (*Theobroma cacao*) plants. *New Phytol* 186:856-868
- Lörz H, Scowcroft WR (1983) Variability among plants and their progeny regenerated from protoplast of Su/su heterozygotes of *Nicotiana tabacum*. *Theor Appl Genet* 66:67-75
- Loureiro J, Pinto G, Lopes T, Doležal J, Santos C (2005) Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry. *Planta* 221:815-822
- Loureiro J, Rodriguez E, Costa A, Santos C (2007) Nuclear DNA content estimations in wild olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *sylvestris*) and Portuguese cultivars of *O. europaea* using flow cytometry. *Genet Resour Crop Ev* 54:21-25
- Lu TG, Sun CS (1992) Cryopreservation of Millet (*Setaria italica* L.). *J Plant Physiol* 139:295-298
- Lynch PT (2000) Applications of cryopreservation to the long term storage of dedifferentiated plant cultures. En: Razdan MK, Cocking EC (eds) *Conservation of Plant Genetic Resources In vitro*. Applications and limitations, vol 2. Science Publishers Inc, Enfield, pp 66-86
- Lynch PT, Siddika A, Johnston JW, Trigwell SM, Mehra A, Benelli C, Lambardi M, Benson EE (2011) Effects of osmotic pretreatments on oxidative stress, antioxidant profiles and cryopreservation of olive somatic embryos. *Plant Sci* 181:47-56
- Maalej M, Chaari-Rkhis A, Chelli-Chaabouni A, Trigui A, Drira N (2002) Preliminary results of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of the olive tree (*Olea europaea* L.). *Acta Hort* pp 899-902
- magrama (2012) Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Disponible en el enlace <http://www.magrama.gob.es/es/>.
- Mallón R, Rodríguez-Oubiña J, González ML (2010) *In vitro* propagation of the endangered

- plant *Centaurea ulreiae*: assessment of genetic stability by cytological studies, flow cytometry and RAPD analysis. *Plant cell Tiss Org Cult* 101:31-39
- Mandal A, Maiti A, Chowdhury B, Elanchezhian R (2001) Isoenzyme markers in varietal identification of banana. *In Vitro Cell Dev PI* 37:599-604
- Marcotrigiano M (1986) Origin of adventitious shoots regenerated from cultured tobacco leaf tissue. *Am J Bot* 73:1541-1547
- Márquez B, Pérez M, Barceló A, Quesada MA, Mercado JA, Pliego-Alfaro F (1999) Organogénesis y embriogénesis somática de olivo (*Olea europaea* L.). En III Congreso de la Sociedad Española de Cultivo *In vitro* de Tejidos Vegetales (Torremolinos)
- Márquez-Martín B (2007) Embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana* Mill.). Tesis Doctoral, Universidad de Málaga
- Márquez-Martín B, Barceló-Muñoz A, Pliego-Alfaro F, Sánchez-Romero C (2012) Somatic embryogenesis and plant regeneration in avocado (*Persea Americana* Mill.): influence of embryogenic culture type. *J Plant Biochem Biot* 21(2):180-188
- Martínez MT, Ballester A, Vieitez AM (2003) Cryopreservation of embryogenic cultures of *Quercus robur* using desiccation and vitrification procedures. *Cryobiology* 46:182-189
- Marum L, Estêvão C, Oliviera MM, Amâncio S, Rodriguez L, Miguel C (2004) Recovery of cryopreserved embryogenic cultures of maritime pine-effect of cryoprotectant and suspension density. *CryoLetters* 25:363-374
- Marum L, Rocheta M, Maroco J, Oliveira MM, Miguel C (2009) Analysis of genetic stability at SSR loci Turing somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*). *Plant Cell Rep* 28:673-682
- Martín A, Rallo L (2005) Mejora genética y biotecnología. En: Rallo L, Barranco D, Caballero JM, del Río C, Martín A, Tous J, Trujillo I (eds) Variedades de Olivo en España. Junta de Andalucía, MAPA - Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, p 480
- Martín C, González-Benito AE (2005) Survival and genetic stability of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev shoot apices after cryopreservation by vitrification and encapsulation-dehydration. *Cryobiology* 51:281-289
- Martín C, Gonzalez-Benito E (2006) Sequence comparison in somaclonal variation of cryopreserved *Dendranthema grandiflora* shoot apices. *Cryobiology* 53:367-446
- Martín C, Gonzalez-Benito E (2009) Cryopreservation and genetic stability of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev *in vitro* cultures. *Agr Food Sci* 18:129-135
- Martín C, Cervera MT, González-Benito ME (2011) Genetic stability analysis of chrysanthemum (*Chrysanthemum x morifolium* Ramat) after different stages of an encapsulation-dehydration cryopreservation protocol. *J Plant Physiol* 168:158-166
- Martínez-Montero ME, Ojeda E, Espinosa A, Sanchez M, Castillo R, González-Arno MT, Engelmann F, Lorenzo JC (2002) Field performance of sugarcane (*Saccharum* so.) plants derived from cryopreserved calluses. *CryoLetters* 23:21-26
- Matthes M, Singh R, Cheah SC, Karp A (2001) Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLPs with methylation-sensitive enzymes. *Theor Appl Genet* 102:971-979
- Mathews H, Wetzstein HY (1993) A revised protocol for efficient regeneration of somatic embryos and acclimatization of plantlets in pecan, *Carya illinoensis*. *Plant Sci* 91:103-108
- Mathur G, Alkuthar VA, Nadgauda RS (2003) Cryopreservation of embryogenic cultures of *Pinus roxburghii*. *Biol Plantarum* 46:205-210
- Mazri MA, Elbakkali A, Belkoura M, Belkoura I (2011) Embryogenic competence of calli and embryos regeneration from various explants of Dahbia cv, a Moroccan olive tree (*Olea europaea* L.). *Afr J Biotechnol* 10(82):19089-19095
- McKeown CME, Waters JJ, Stacey M, Newman BF, Cardy DLN, Hulten M (1992) Rapid

- interphase FISH diagnostic of trisomy 18 in blood smears. *Lancet* 340:495-499
- McMeans, Skirvin RM, Otterbacher A, Mitiku G (1998) Assessment of tissue culture-derived 'Gala' and 'Royal Gala' apples (*Malus x domestica* Borkh.) for somaclonal variation. *Euphytica* 103:251-257
- McWilliam AA, Smith SM, Street HE (1974) The origin and development of embryoids in suspensions cultures of carrot (*Daucus carota*). *Ann Bot-London* 38:243-250
- Mehta YR, Angra DC (2000) Somaclonal variation for disease resistance in wheat and production of dihaploids through wheat x maize hybrids. *Genet Mol Biol* 23:617-622
- Mekuria GT, Collins GG, Sedgley M (1999) Genetic variability between different accessions of some common commercial olive cultivars. *J Hortic Sci Biotech* 74:309-314
- Mencuccini M, Rugini E (1993) *In vitro* shoot regeneration from olive cultivar tissues. *Plant Cell Tiss Org Cult* 32:283-288
- Mencuccini M, Micheli M, Angiolillo A, Baldoni L (1999) Genetic transformation of olive (*Olea europaea* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Hortic* 474:515-520
- Mencuccini M (1991) Protoplast culture isolated from different tissues of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Physiol Plantarum* 82:A14
- Merkle SA (1995) Somatic embryogenesis in Magnoliaceae (*Liriodendron* and *Magnolia*). En: Bajaj YPS (ed). *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer Verlag, Berlin, 30:388-403
- Merkle SA, Parrot WA, Flinn BS (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe TA (ed) *In vitro* Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp 155-204
- Meudt HM, Clarke AC (2007) Almost forgotten or latest practice? AFLP applications analyses and advances. *Trends Plant Sci* 12:106-117
- Mhiri C, Morel J-B, Vernhettes S, Casacuberta JM, Lucas H, Grandbastien M-A (1997) The promoter of the tobacco Tnt1 retrotransposon is induced by wounding and by abiotic stress. *Plant Mol Biol* 33:257-266
- Mikula A, Fiuk A, Rybczyński JJ (2005) Induction, maintenance and preservation of embryogenic competent of *Gentiana cruciata* L. cultures. *Acta Biol Cracov Bot* 47:227-236
- Mikula A (2010) Cryopreservation efficacy in protection of (epi)genetic stability of plant material. *Biotechnologia* 2(89):23-37
- Mikula A, Tomiczak K, Rybczynski JJ (2011) Cryopreservation enhances embryogenic capacity of *Gentiana cruciata* (L.) suspension culture and maintains (epi)genetic uniformity of regenerants. *Plant Cell Rep* 30:565-574
- Miller SS, Tworkoski T (2003) Regulating vegetative growth in deciduous fruit trees. *PGRSA Quarterly* 31(1):8-46
- Misson J-P, Druart P, Panis B, Watillon B (2006) Contribution to the study of the maintenance of somatic embryos of *Abies nordmanniana* LK.: cell culture media and cryopreservation method. *Propag Ornament Plants* 6:17-23
- Mitrakos K, Alexaki A, Papadimitriou P (1992) Dependence of olive morphogenesis on callus origin and age. *J Plant Physiol* 139:269-273
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405-10
- Mizukami M, Takeda T, Satonaka H, Matsuoka H (2008) Improvement of propagation frequency with two-step direct somatic embryogenesis from carrot hypocotyls. *Biochem Eng J* 38:55-60
- Mohan SJ (2001) Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118:153-166
- Molle F, Dupuis JM, Ducos JP, Anselm A, Crolus-Savidan I, Petiard V, Freyssinet G (1993) Carrot somatic embryogenesis and its application to synthetic seeds. En: Redenbaugh K (ed) *Synseed Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement*. CRC Press Boca

- Raton, pp 257-288
- Morettini A (1972) Olivicoltura. Ramo Editoriale degli Agricoltori, Roma, pp 335-357
- Morozova EM (2002) Additional nuclear DNA in cells of embryo sacs of *Haemanthus albiflos* and *Ornithogalum caudatum*. Biol Bull 29(2):192-195
- Morrish FM, Hanna WW, Vasil IK (1983) The expression and perpetuation of inherent somatic variation in regenerants from embryogenic cultures of *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. (pearl millet). Theor Appl Genet 80:409-416
- Muleo R, Colao MC, Miano D, Cirilli M, Intrieri MC, Baldoni L, Rugini E (2009) Mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis in olive germplasm. Genome 52:252-260
- Mujib A, Banerjee S, Gosh PD (2005) Origin, development, and structure of somatic embryos in selected bulbous ornamentals: BAP as inducer. En: Mujib A, Samaj J (eds) Plant Cell Monogr (2) Somatic Embryogenesis. Springer-Verlag, Berlin, pp 15-24
- Mujib A, Banerjee S, Dev Ghosh P (2007) Callus induction, somatic embryogenesis and chromosomal instability in tissue culture-raised hippeastrum (*Hippeastrum hybridum* cv. United nations). Propag Ornament Plants 7:169-174
- Mulé R, Fodale AS, Parlanti MVM, Tucci A (1992) Tonda dolce Partanna: nuova varietà di olivo da mensa a maturazione precocissima. Riv Frutt 11:25-29
- Müller J, Day JG, Harding K, Hepperle D, Lorenz M, Friedl T (2007) Assessing genetic stability of a range of terrestrial microalgae after cryopreservation using amplified fragment length polymorphism (AFLP). Am J Bot 94:799-808
- Munthali MT, Newbury HJ, Ford-Lloyd BV (1996) The detection of somaclonal variants of beet using RAPD. Plant Cell Rep 15:474-478
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plantarum 15:473-497
- Nakano M, Nomizu T, Mizunashi K, Suzuki M, Mori S, Kuwayama S, Hayashi M, Umehara H, Oka E, Kobayashi H, Asano M, Sugawara S, Takagi H, Saito H, Nakata M, Godo T, Hara Y, Amano J (2006) Somaclonal variation in *Tricyrtis hirta* plants regenerated from 1 year old embryogenic callus cultures. Sci Hortic-Amsterdam 110:366-371
- Nakazaki T, Okumoto Y, Horibata A, Yamahira S, Teraishi M, Nishida H, Inoue H, Tanisaka T (2003) Mobilization of a transposon in the rice genome. Nature 421:170-172
- Namasivayam P (2007) Acquisition of embryogenic competent during somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss Org Cult 90:1-8
- Neelakandan AK, Wang K (2012) Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. Plant Cell Rep 31:597-620
- Nehra NS, Kartha KK, Stushnott C, Giles KL (1992) The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry. Plant Cell Tiss Org Cult 29:257-268
- Neumann KH (2000) Some studies on somatic embryogenesis: a tool in plant biotechnology. <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2000/321/>
- Nieves N, Martínez ME, Catillo R, Blanco MA, González-Olmedo JL (2001) Effect of abscisic acid and jasmonic acid on partial desiccation of encapsulated somatic embryos of sugarcane. Plant Cell Tiss Org Cult 65:15-21
- Nishizawa S, Sakai A, Amano Y, Matsuzawa T (1992) Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by a simple freezing method. CryoLetters 13:379-388
- Nishizawa S, Sakai A, Amano Y, Matsuzawa T (1993) Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspensions cells and subsequent plant regeneration by the vitrification method. Plant Sci 91:67-73



- Niu DK, Wang MG, Wang YF (1997) Plant cellular osmotica. *Acta Biotheor* 45:161-169
- Nomura K, Komamine A (1985) Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiol* 79:988-991
- Nookaraju A, Agrawal DC (2012) Genetic homogeneity of *in vitro* raised plants of grapevine cv. Crimson Seedless revealed by ISSR and microsatellite markers. *S Afr J Bot* 78:302-306
- Nørgaard JV, Duran V, Johnsen O, von Arnold S (1993) Variation in cryotolerance of embryogenic *Picea abies* cell lines and the association to genetic, morphological, and physiological factors. *Can J Forest Res* 23:2560-2567
- Oliver AE, Crowe LM, Crowe JH (1998) Methods for dehydration-tolerance: depression of the phase transition temperature in dry membranes and carbohydrate vitrification. *Seed Sci Res* 8:211-221
- Omrani-Sabbaghi A, Shahriari M, Falahati-Anbaran M, Mohammadi SA, Nankali A, Mardi M, Ghareyazie B (2007) Microsatellite markers based assessment of genetic diversity in Iranian olive (*Olea europaea* L.) collections. *Sci Hortic-Amsterdam* 112:439-447
- Orinos T, Mitrakos K (1991) Rhizogenesis and somatic embryogenesis in calli from wild olive [*Olea europaea* var. *sylvestris* (Miller) Lehr] mature zygotic embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult* 27:183-187
- Orton TJ (1980) Chromosome variability in tissue culture and regenerated plants of *Hordeum*. *Theor Appl Genet* 56:101-112
- Ozudogru EA, Capuana M, Kaya E, Panis B, Lambardi M (2010) Cryopreservation of *Fraxinus excelsior* L. embryogenic callus by one-step freezing and slow cooling techniques. *CryoLetters* 31:63-75
- Panis B, Withers LA, De Langhe E (1990) Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. *CryoLetters* 11:337-350
- Panis B (1995) Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) germplasm. *Katholieke Universiteit, Leuven*, p (272) 216
- Panis B, Totté N, Van Nimmen K, Withers LA, Swennen R (1996) Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after preculture on sucrose. *Plant Sci* 121:95-106
- Panis B, Strosse H, Van den Hende S, Swennen R (2002) Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana meristems cultures. *CryoLetters* 23:375-384
- Panis B, Piette B, Swennen R (2005) Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Sci* 168:45-55
- Pannelli G, Famiani F, Rugini E, Bignami D, Natali S (1990) Preliminary characteristics of olive somatic mutants from gamma irradiated 'Frantoio' and 'Leccino' plantlets. *Acta Hortic* 286:77-80
- Park SY, Moon HK, Murthy HN, KIM YW (2011) Improved growth and acclimatization of somatic embryo-derived *Oplopanax elatus* plantlets by ventilated photoautotrophic culture. *Biol Plantarum* 55(3):559-562
- Parlati MV, Bellini E, Perri E, Pandolfi S, Giordani E, Martelli S (1994) Genetic improvement of olive: initial observations on selections made in Florence. *Acta Hortic* 356:87-90
- Parrott WA, Dryden G, Vogt S, Hildebrand DF, Collins GB, Williams EG (1988) Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. *In vitro Cell Dev Pl* 24:817-821
- Paulet F, Engelmann F, Glaszmann J-C (1993) Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp. Hybrids) using encapsulation/dehydration. *Plant Cell Rep* 12:525-529
- Pelah D, Wang W, Altman A, Shoseyov O, Bartels D (1997) Differential accumulation of water stress-related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in *Populus* species that differ in their water stress response. *Plant Physiol* 99:153-159
- Perán-Quesada R (2001) Embriogenesis *in vitro* de aguacate (*Persea americana* Mill.). Tesis

- Doctoral, Universidad de Málaga
- Peredo EI, Revilla MA, Arroyo-García R (2006) Assessment of genetic and epigenetic variation in hop plants regenerated from sequential subcultures of organogenic calli. *J Plant Physiol* 163:1071-1079
- Peredo EI, Arroyo-García R, Reed BM, Revilla MA (2008) Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.). *Cryobiology* 57:234-41
- Pérez RM (2000) Cryostorage of Citrus embryogenic cultures. En: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, vol 6. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 687-705
- Pérez-Barranco G, Mercado JA, Pliego-Alfaro F, Sánchez-Romero C (2007) Genetic transformation of olive somatic embryos through biolistics. *Acta Hort* 738:473-477
- Pérez-Barranco G, Torreblanca R, Padilla IMG, Sánchez-Romero C, Pliego-Alfaro F, Mercado JA (2009) Studies on genetic transformation of olive (*Olea europaea* L.) somatic embryos: I. Evaluation of different aminoglycoside antibiotics for nptII selection; II. Transient transformation via particle bombardment. *Plant Cell Tiss Org Cult* 97:243-251
- Perri E, Parlato MV, Rugini E (1994a) Isolation and culture of olive (*Olea europaea* L.) cultivar protoplasts. *Acta Hort* 356:51-53
- Perri E, Parlato MV, Mulé R, Fodale AS (1994b) Attempts to generate haploid plants from *in vitro* cultures of *Olea europaea* L. anthers. *Acta Hort* 356:47-50
- Persidsky M, Baillie GS (1977) Fluorometric test of cell membrane integrity. *Cryobiology* 14:322-331
- Peschke VM, Phillips RL, Gengenbach BG (1987) Discovery of transposable element activity among progeny of tissue culture-derived maize plants. *Science* 238:804-807
- Peschke VM, Phillips RL (1991) Activation of the maize transposable element suppressor-mutator (Spm) in tissue culture. *Theor Appl Genet* 81:90-97
- Petolino JF, Roberts JL, Jayakumar P (2003) Plant cell culture: a critical tool for agricultural biotechnology. En: Vinci VA, Parekh SR (eds) *Handbook of Industrial Cell Culture: Mammalian, Microbial and Plant Cells*. Human Press, New Jersey pp 243-258
- Pfosser M, Herberle-Bors E, Amon A, Lelley T (1995) Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry* 21:387-393
- Phillips RL, Kaeppler SM, Peschke VM (1990) Do we understand somaclonal variation? En: Nijkamp HJJ, Van der Plas LHW, Van Aartrijk J (eds) *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Kluwer, Dordrecht, pp 131-141
- Phillips RL, Kaeppler SM, Olhoft P (1994) Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5222-5226
- Piagnani MC, Maffi D, Rossoni M, Chiozzotto R (2008) Morphological and physiological behaviour of sweet cherry 'somaclone' HS plants in field. *Euphytica* 160:165-173
- Pierce BA (2013) *Genetics Essentials Concepts and Connections* 2ª edition. Freeman, New York
- Pijnaker LP, Hermelin JHM, Ferwerda MA (1986) Variability of DNA content and karyotype in cell cultures of an interdiplaploid *Solanum tuberosum*. *Plant Cell Rep* 5:43-46
- Pinker I, Halmagyi A, Olbricht K (2009) Effects of sucrose preculture on cryopreservation by droplet-vitrification of strawberry cultivars and morphological stability of cryopreserved plants. *CryoLetters* 30:202-211
- Popescu AN, Isac VS, Coman MS, Radulescu MS (1997) Somaclonal variation in plants regenerated by organogenesis from callus cultures of strawberry (*Fragaria x Ananassa*). *Acta Hort* 439:89-96
- Pouteau S, Grandbastien M-A, Boccara M (1994) Microbial elicitors of plant defence responses activate transcription of a retrotransposon. *Plant J* 5:535-542

- Powell W, Gordon C, Machray J, Provan J (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci* 1:215-222
- Prat D (1983) Genetic variability induced in *Nicotiana sylvestris* by protoplast culture. *Theor Appl Genet* 64(3):223-230
- Preece JE, Sutter EG (1991) Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. En: Debergh PC, Zimmerman RH (eds) *Micropropagation, Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 71-93
- Predieri S (2001) Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell Tiss Org Cult* 64:185-210
- Preil W (1986) *In vitro* propagation and breeding of ornamental plants: advantages and disadvantages of variability. En: Horn W, Jensen CJ, Odenbach W, Schieder O (eds) *Genetic Manipulation in Plant Breeding*. De Gruyter, Berlin, pp 337-403
- Pritsa TS, Voyiatzis DG, Voyiatzi CJ, Sotiriou MS (2003) Evaluation of vegetative growth traits and their relation to time to first flowering of olive seedlings. *Aust J Agr Res* 54:371-376
- Rahman MH, Rajora OP (2001) Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Plant Cell Rep* 20:531-536
- Rai MK, Phulwaria M, Gupta HAK, Shekhawat UJ (2012) Genetic homogeneity of guava plants derived from somatic embryogenesis using SSR and ISSR markers. *Plant Cell Tiss Org Cult* 111:259-264
- Raimondi JP, Masuelli RW, Camadro EL (2001) Assessment of somaclonal variation in asparagus by RAPD fingerprinting and cytogenetic analyses. *Sci Hortic-Amsterdam* 90:19-29
- Rallo L (1995) Selection and breeding of olive in Spain. *Olivae* 59:46-53
- Rallo L, Barranco D, De la Rosa R, León L (2008) 'Chiquitita' olive. *Hortic Sci* 43(2):529-531
- Rama P, Pontikis C (1991) *In vitro* propagation of olive (*Olea europaea* L.). *J Hortic Sci* 65(3):347-353
- Ramon M, Geuns JMC, Swennen R, Panis B (2002) Polyamines and fatty acids in sucrose precultured banana meristems and correlation with survival rate after cryopreservation. *CryoLetters* 23:345-352
- Rani V, Parida A, Raina SN (1995) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. *Plant Cell Rep* 14:459-462
- Rani V, Raina SN (2000) Genetic fidelity of organized meristem derived micropropagated plants: a critical reappraisal. *In vitro Cell Dev PI* 36:319-330
- Rapoport HF (1997) Botánica y morfología. En: Barranco D, Fernández-Escobar D, Rallo L (eds) *El Cultivo del Olivo*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp 35-58
- Reale S, Doveri S, Díaz A, Angiolillo A, Lucentini L, Pilla F, Martín A, Donini P, Lee D (2006) SNP-based markers for discrimination olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Genome* 49:1193-1205
- Reed BM, Chang Y (1997) Medium and long term storage of *in vitro* cultures of temperate fruit and nut crops. En: Razdan MK, Coking EC (eds) *Conservation of Plant Genetic Resources In vitro, General Aspects*, vol 1. Science Publishers, USA, pp 67-105
- Reed BM (2001) Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *CryoLetters* 22:97-104
- Reed BM (2008) Cryopreservation-Practical considerations. En: Reed BM (ed) *Plant Cryopreservation, a practical guide*. Springer, Nueva York, pp 3-13
- Reed BM, Uchendu EE (2008) Controlled Rate Cooling. En: Reed BM (ed) *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer-Science, New York, pp 77-88
- Reinert J, Backs D (1968) Control of totipotency in plant cells growing *in vitro*. *Nature* 220:1340-1341



- Reinert J, Backs-Husemann D, Zerban H (1971) Determination of embryo and root formation in tissue cultures from *Daucus carota*. En: Centre Nat Rech Scient (ed) Les cultures de Tissus de Plantes. CNRS, Paris, 193:261-268
- Reinhoud PJ, Schrijnemakers EWM, van Iren F, Kijne JW (1995) Vitrification and heat-shock treatment improve cryopreservation of tobacco cell suspensions compared to two-step freezing. *Plant Cell Tiss Org Cult* 42:261-267
- Reinhoud PJ, Van Iren F, Kijne JW (2000) Cryopreservation of differentiated plant cells. En: Engelmann F, Takagi H (eds) *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm-Current Research Progress and Applications*. IPGRI, Rome, pp 91-102
- Reuveni O, Israeli Y (1990) Measures to reduce somaclonal variation in *in vitro* propagated bananas. *Acta Hort* 275:307-313
- Revilla MA, Pacheco J, Casares A, Rodriguez R (1996) *In vitro* reinvigoration of mature olive trees (*Olea europaea* L.) through micrografting. *In vitro Cell Dev PI* 32:257-261
- Rice TB, Reid RK, Gordon PN (1978) Morphogenesis in field crops. En: Hughes KW, Henke R, Constantin M (eds) *Propagation of Higher Plants Through Tissue Culture*. Energy Springfield, pp 262-277
- Roberts DR, Flinn BS, Webb DT, Webster FB, Sutton BCS (1990) Abscissic acid and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce. *Physiol Plantarum* 78:355-360
- Roberts DR, Webster FB, Flinn BS, Lazaroff WR, Cyr DR (1993) Somatic embryogenesis of spruce. En: Redengough K (ed) *Synseeds: Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement*. Press Boca Raton, Florida, pp 427-449
- Rodrigues PHV, Tulmann Neto A, Cassieri Neto P, Mendes BMJ (1998) Influence of the number of subcultures on somoclonal variation in micropropagated Nanico (*Musa spp.*, AAA group). *Acta Hort* 90:469-473
- Rohlf FJ (1992) The analysis of shape variation using ordinations of fitted functions. En: Sorensen JT, Footitt R (eds) *Ordinations in the Study of Morphology, Evolution and Systematics of Insects: Applications and Quantitative Genetic Rationals*. Elsevier, Amsterdam, pp 95-112
- Rotman B, Papermaster BW (1966) Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc Natl Acad Sci USA* 55:134-141
- Rubio MJ, Arus P (1997) Un vivero 'Agronellia catalana' aplica en su producción de plantas de olivo un control basado en las tecnologías de RAPDs y ELISA-DAS. *Fruticultura* 88:14-18
- Rugini E, Fontanazza G (1981) *In vitro* propagation of 'Dolce Agogia' olive. *Hortic Sci* 16:492-493
- Rugini E (1984) *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and development using an analytical data from developing shoots and embryos. *Sci Hort*-Amsterdam 24:123-134
- Rugini E (1986) Olive. En: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol 10. Springer, Berlin, pp 253-267
- Rugini E (1988) Somatic embryogenesis and plant regeneration in Olive (*Olea europaea* L.). *Plant Cell Tiss Org Cult* 14:207-214
- Rugini E (1995) Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). En: Jain S, Gupta P, Newton R (eds) *Somatic Embryogenesis in Woody plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 171-189
- Rugini E, Caricato G (1995) Somatic embryogenesis and plant recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europaea* L.) 'Canino' and 'Moraiolo'. *Plant Cell Rep* 14:257-260
- Rugini E, Pezza A, Muganu M, Caricato G (1995) Somatic Embryogenesis in Olive (*Olea europaea* L.). En: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed 1*. Verlag, Berlin, 30:404-414

- Rugini E, Pannelli G, Ceccarelli M, Muganu M (1996) Isolation of triploid and tetraploid olive (*Olea europaea* L.) plants from mixoploid cv. 'Frantoio' and 'Leccino' mutants by *in vivo* and *in vitro* selection. *Plant Breeding* 115:23-27
- Rugini E, Gutierrez-Pesce P, Sampinato PL (1999) New perspective for biotechnologies in olive breeding: morphogenesis, *in vitro* selection and gene transformation. *Acta Hort* 474:107-110
- Rugini E, Biasi R, Muleo R (2000) Olive (*Olea europaea* var. *sativa*) transformation. En: Jain SM, Minocha SC (eds) *Molecular Biology of Woody Plants*, vol 2. Kluwer, Dordrecht, pp 245-279
- Rugini E, Baldoni L (2005) *Olea europaea* Olive. En: Litz RE (ed) *Biotechnology in Agriculture Series. Biotechnology of Fruit and Nut Crops*. CABI Publishing, Cambridge, 29:404-428
- Rugini E, Gutiérrez-Pesce P (2006) Genetic improvement of olive. *Pomologia Croatica* 12:43-74
- Rugini E, De Pace C, Gutiérrez-Pesce P, Muleo R (2011) *Olea*. En: Kole C (ed) *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*. Springer, Berlin, pp 79-117
- Sabir AA, Newbury HJ, Todd G, Catty J, Ford-Lloyd BV (1992) Determination of genetic stability using isozymes and RFLPs in beet plants regenerated *in vitro*. *Theor Appl Genet* 84:113-117
- Sadok IB, Celton J-M, Essalouh L, El Aabidine AZ, Garcia G, Martinez S, Grati-Kamoun N, Rebai A, Costes E, Khadari B (2013) QTL Mapping of Flowering and Fruiting Traits in Olive. *PLoS ONE* 8(5):e62831
- Sahijram L, Soneji J, Bollamma K (2003) Analysing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). *In vitro Cell Dev PI* 39:551-556
- Saieed NT, Douglas GC, Fry DJ (1994) Induction and stability of somaclonal variation in growth, leaf phenotype and gas exchange characteristics of poplar regenerated from callus-culture. *Tree Physiol* 14:1-16
- Sakai A, Yoshida S (1967) Survival of plant tissue at super-low temperatures. VI. Effects of cooling and rewarming rates on survival. *Plant Physiol* 42:1695-1701
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus Sinensis* Osb var *Brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep* 9:30-33
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1991) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Obs.) by simple freezing method. *Plant Sci* 74:243-248
- Sakai A (1995) Cryopreservation of germplasm of Woody plants. En: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol 32. Cryopreservation of Plant Germplasm I. Springer-Verlag, Berlin, pp 53-69
- Sakai A, Matsumoto T, Hirai D, Niino T (2000) Newly developed encapsulation-dehydration protocol for plant cryopreservation. *CryoLetters* 21:53-62
- Sakai A, Engelmann F (2007) Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters* 28:151-172
- Sakai A, Hirai D, Niino T (2008) Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification Protocols. En: Reed BM (ed) *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer-Science, New York, pp 33-59
- Sala F, Cella R, Rollo F (1979) Freeze-preservation of rice cells brown in suspensión culture. *Physiol Plantarum* 45:170-176
- Salaj T, Panis B, Swennen R, Salaj J (2007) Cryopreservation of embryogenic tissues of *Pinus nigra* Arn. By a slow freezing method. *CryoLetters* 28:69-76
- Salaj T, Matušiková I, Fráterová L, Piršelová B, Salaj J (2011) Regrowth of embryogenic tissues of *Pinus nigra* following cryopreservation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 106:55-61
- Sánchez-Romero C, Perán-Quesada R, Barceló-Muñoz A (2002) Variations in storage protein and carbohydrate levels during development of avocado zygotic embryos. *Plant Physiol Bioch* 40:1043-1049

- Sánchez-Romero C, Panis B, Swennen R (2009) Cryopreservation of olive embryogenic cultures. *CryoLetters* 30:359-372
- Sánchez C, Martínez MT, Vidal N, San-Jose MC, Valladares S, Vieitez AM (2008) Preservation of *Quercus robur* germplasm by cryostorage of embryogenic cultures derived from mature trees and RAPD analysis of genetic stability. *CryoLetters* 29:493-504
- Sant R, Panis B, Taylor M, Tyagi A (2008) Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var *esculenta*) accessions. *Plant Cell Tiss Org Cult* 92:107-111
- Santos-Macedo E, Cardoso HG, Hernández A, Peixe AA, Polidoros A, Ferreira A, Cordeiro A, Arnholdt-Schmitt B (2009) Physiologic responses and gene diversity indicate olive alternative oxidase as a potential source for markers involved in efficient adventitious root induction. *Physiol Plantarum* 137:532-552
- Sacristan MD, Melchers G (1969) The caryological analysis of plants regenerated from tumorous and other callus cultures of tobacco. *Mol Gen Genet* 105:317-333
- Schafer-Menuhar A, Schumacher H, Wangner G (1997) Long-term storage of old potato varieties by cryopreservation of shoot-tips in liquid nitrogen. *Plant Gen Res News Lett* 111:19-24
- Senaratna T, McKersie BD, Bowley SR (1990) Artificial seeds of Alfalfa (*Medicago sativa* L.): Induction of desiccation tolerance in somatic embryos. *In vitro Cell Dev PI* 26:85-90
- Sensi E, Vignani R, Scali M, Masi E, Cresti M (2003) DNA fingerprinting and genetic relatedness among cultivated varieties of *Olea europaea* L. estimated by AFLP analysis. *Sci Hortic-Amsterdam* 97:379-388
- Sharma S, Bryan G, Winfield M, Millam S (2007) Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. *Planta* 226:1449-1458
- Sharp WR, Evans DA, Sondahl MR (1982) Application of somatic embryogenesis to crop improvement in plant tissue culture. En: Fujiwara A (ed) *Proceeding of the 5<sup>th</sup> International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*. Tokyo, pp 759-762
- Shenoy VB, Vasil IK (1992) Biochemical and molecular analysis of plants derived from embryogenesis tissue cultures of napier grass (*Pennisetum purpureum* K. Schum). *Theor Appl Genet* 83:947-955
- Shepard JF, Bidney D, Shahin E (1980) Potato protoplasts in crop improvement. *Science* 208:17-24
- Shibli RA (2000) Cryopreservation of black iris (*Iris nigricans*) somatic embryos by encapsulation-dehydration. *Cryoletters* 21:39-46
- Shibli RA, Al-Juboory KH (2000) Cryopreservation of nabali olive (*Olea europaea* L.) somatic embryos by encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification. *CryoLetters* 21:357-366
- Shibli RA, Shatnawi M, Abu-Ein Al-Juboory KH (2001) Somatic embryogenesis and plant recovery from callus of Nabali olive (*Olea europaea* L.). *Sci Hortic-Amsterdam* 88:243-256
- Shimonishi K, Ishikawa M, Suzuki S, Oosawa K (2000) Cryopreservation of melo somatic embryos by dessication method. En: Engelmann F, Takagi H (eds) *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*. IPGRI, Rome, pp 167-171
- Sibi M (1990) Genetic bases of variation from *in vitro* tissue culture. En: Bajaj YPS (ed) *Somaclonal Variation in Crop Improvement*. I. Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol II. Springer-Verlag, Berlin, pp 112-133
- Singh SK, Rai MK, Sahoo L (2012) An improved and efficient micropropagation of *Eclipta alba* through transverse thin cell layer culture and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. *Ind Crop prod* 37:328-333

- Skirvin RM, McPheeters KD, Norton M (1994) Sources and frequency of somaclonal variation. *Hortic Sci* 29:1232-1237
- Smith SM, Street HE (1974) The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot are serially subcultured. *Ann Bot-London* 38:223-241
- Smýkal P, Valledor L, Rodriguez R, Griga M (2007) Assessment of genetic and epigenetic stability in long term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Rep* 26:1985-1998
- Smulders AJM, de Klerk GJ (2011) Epigenetic in plant tissue culture. *Plant Growth Regul* 63:137-146
- Sokal RR, Rohlf FJ (2003) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. Freeman and Company, New York, p 850
- Söndahl MR, Lauritis JA (1992) Coffee. En Hammerschlag FA, Litz RE (eds) *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*. Wallingford, UK, 8:401-420
- Sopalun K, Kanchit K, Ishikawa K (2010) Vitrification-based cryopreservation of *Grammatophyllum speciosum* protocorm. *CryoLetters* 31(4):347-357
- Spooner D, Treuren VR, de-Vicente MC (2005) Molecular markers for genebank Management. IPGRI technical Bulletin Nº 10, p 126
- Srivastava V, Khan SA, Banerjee S (2009) An evaluation of genetic fidelity of encapsulated microshoots of the medicinal plant *Cineraria maritima* following six months of storage. *Plant Cell Tiss Org Cult* 99:193-198
- Stasolla C, Yeung EC (2003) Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tiss Org Cult* 74:15-35
- Stenpokus PL, Lamphear FO (1962) Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol* 42:1423-1426
- Steponkus PL, Langis R, Fujikawa S (1992) Cryopreservation of plant tissue by vitrification. En: Steponkus PL (ed) *Advances in Low Temperature Biology*, vol 1. JAI Press, Hampton Hill, UK, pp 1-61
- Stewart CR, Voetberg G (1985) Relationship between stress-induced ABA and proline accumulation and ABA-induced proline accumulation excised barley leaves. *Plant Physiol* 79:24-27
- Surenciski MR, Dematteis M, Flachslund E (2007) Chromosome stability in cryopreserved germplasm of *Cyrtopodium hatschbachii* (*Orchidaceae*). *Ann Bot Fenn* 44:287-292
- Sun ZX, Zhao C, Zheng K, Qi X, Fu Y (1983) Somaclonal genetics of rice, *Oryza sativa* L. *Theor Appl Genet* 67:67-73
- Suzuki M, Ishikawa M, Okuda H, Noda K, Kishimoto T, Nakamura T, Ogiwara I, Shimura I, Akihama T (2006) Physiological changes in Gentian axillary buds during two-step preculturing with sucrose that conferred high levels of tolerance to desiccation and cryopreservation. *Ann Bot-London* 97:1073-1081
- Sweldlund BD, Vasil IK (1985) Cytogenetic characterization of embryogenic callus and regenerated plants of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. *Theor Appl Genet* 69:575-581
- Symillides Y, Henry Y, de Buyser J (1995) Analysis of Chinese Spring regenerants obtained from short and long term wheat somatic embryogenesis. *Euphytica* 82:263-268
- Tahara M, Aoki T, Suzuka S, Yamashita H, Tanaka M, Matsunaga S, Kokumai S (2004) Isolation of an active element from a high-copy-number family of retrotransposons in the sweet potato genome. *Mol Genet Genomics* 272:116-127
- Takagi H (2000) Recent development in cryopreservation of shoot apices of tropical species. En: Engelmann F, Takagi H (eds) *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current Research Progress and application*, IPGRI, Rome, pp 178-193
- Taylor MJ, Song YC, Brockbank KGM (2004) Vitrification in tissue preservation: New



- developments. En: Fuller B, Lane N, Benson EE (ed) Life in the Frozen State. CRC Press, Londres, pp 329-345
- Teresa HP, Pawel C, Marcin M, Krystina B (2010) Cryopreservation of embryogenic tissues of *Picea omorika* (Serbian spruce). Plant Cell Tiss Org Cult 102:35-44
- Terzopoulos PJ, Kolano B, Bebeli PJ, Kaltsikes PJ (2005) Identification of *Olea europaea* L. cultivars using intersimple sequence repeat markers. Sci Hortic-Amsterdam 105:45-51
- Tessereau H, Florin B, Meschine MC, Thierry C, Pétiard V (1994) Cryopreservation of somatic embryos : a tool for germplasm storage and commercial delivery of selected plants. Ann Bot-London 74:547-555
- Thorpe TA (1990) Organogenesis: structural, physiological and biochemical aspects. En: Rodriguez R, Sánchez Tamés R, Durzan DJ (eds) Plant Aging: Basic and Applied Approaches. Plenum Press, New York, pp 191-197
- Thierry C, Tessereau H, Florin B, Meschine M, Petiard V (1997) Role of sucrose for the acquisition of tolerance to cryopreservation of carrot somatic embryos. Cryoletters 18:283-292
- Thinh NT (1997) Cryopreservation of germplasm of vegetatively propagated tropical monocots by vitrification. PhD Dissertation, Kobe University
- Thinh NT, Takagi H (2000) Cryopreservation of *in vitro* grown apical meristems of terrestrial orchids (*Cymbidium* spp.) by vitrification. En: Engelmann F, Takagi H (eds) Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Applications. IPGRI, Rome, pp 441-443
- Torreblanca R, Palomo-Ríos E, Cerezo S, Mercado JA, Pliego-Alfaro F (2009) *Agrobacterium*-mediated transformation of olive (*Olea europaea* L.) embryogenic cultures. Acta Hortic 839:387-391
- Torreblanca R, Cerezo S, Palomo-Ríos E, Mercado JA, Pliego-Alfaro F (2010) Development of a high throughput system for genetic transformation of olive (*Olea europaea* L.) plants. Plant Cell Tiss Org Cult 103:61-69
- Touchell DH, Dixon KW (1996) In *In vitro* Conservation of Plant Genetic Resources. En: Normah MN, Narimah MK, Clyde MM (eds) Plant Biotechnology Laboratory. University Kebangsaan, Malaysia, pp 169-180
- Touchell DH, Chiang VL, Tsai CJ (2002) Cryopreservation of embryogenic cultures of *Picea mariana* (black spruce) using vitrification. Plant Cell Rep 21:118-124
- Towill LE, Mazur P (1975) Studies on the reduction of 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures. Can J Botany 53:1097-1102
- Trabelsi EB, Bouzid S, Bouzid M, Elloumi N, Belfeleh Z, Benabdallah A, Ghezel R (2003) *In vitro* regeneration of olive tree by somatic embryogenesis. J Plant Biol 46:173-180
- Trabelsi EB, Naija S, Elloumi N, Belfeleh Z, Msellem M, Ghezel R, Bouzid S (2011) Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of olive *Olea europaea* (L.) 'Chetoui'. Acta Physiol Plant 33:319-324
- Tremblay L, Levasseur C, Tremblay FM (1999) Frequency of somaclonal variation in plants of black spruce (*Picea mariana*, Pinaceae) and white spruce (*Picea. glauca*, Pinaceae) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability. Am J Bot 86:1373-1381
- Trigui A (1996) Improving the quantity and quality of olive production in Tunisia: Unavoidable need and outlook for olive identification and breeding. Olivae 61:34-40
- Tsai SF, Yeh SD, Chan CF, Liaw SI (2009) High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of transgenic lines. Plant Cell Tiss Org Cult 98:157-164
- Turner S, Senarata T, Touchell D, Bunn E, Dixon K, Tan B (2001) Stereochemical arrangement of hydroxyl groups in sugars and polyalcohol molecules as an important factor in effective

- cryopreservation. *Plant Sci* 160:489-497
- Unai E, Iselen T, de Garcia (2004) Comparison of characteristics of bananas (*Musa* sp.) from the somaclone CIEN BTA-03 and its parental clone Williams. *Fruits* 59:257-263
- Uragami A, Sakai A, Magai M (1990) Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown *in vitro*. *Plant Cell Rep* 9:328-331
- Valkonen JPT, Moritz T, Watanabe KN, Rokka VM (1999) Dwarf (di)haploid potato mutants obtained from a tetraploid potato cultivar (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) via anther culture are defective in gibberellin biosynthesis. *Plant Sci* 149:51-57
- Valladares S, Toribio M, Celestino C, Vieitez A (2004) Cryopreservation of embryogenic cultures from mature *Quercus suber* tree using vitrification. *CryoLetters* 25:177-186
- Valle MP, Wang ZY, Montavon P, Potrykus I, Spangenberg G (1993) Analysis of genetic stability of plants regenerated from suspension cultures and protoplasts of meadow fescue (*Festuca pratensis*). *Plant Cell Rep* 12:101-106
- Vandenbussche B, Leuridan S, Verdoodt V, Gysemberg M, De Proft M (1999) Changes in sugar content and fatty acid composition of *in vitro* sugar beet shoots after cold acclimation: influence on survival after cryopreservation. *Plant Growth Regul* 28:157-163
- Van den Houwe I, Panis B (2000) *In vitro* conservation of banana: medium-term storage and prospects for cryopreservation. En: Razdan MK, Cocking EC (eds) *Conservation of Plant Genetic Resources*, vol 2. Science Publishers Inc, Enfield, pp 225-257
- Vannini GL, Poli F (1983) Binucleation and abnormal chromosome distribution in *Euglena gracilis* cells treated with dimethylsulphoxide. *Protoplasma* 114:62-66
- Varshney A, Lakshmikumaran M, Srivastava PS, Dhawan V (2001) Establishment of genetic fidelity of *in vitro*-raised *Lilium bulblets* through RAPD markers. *In Vitro Cell Dev Biol* 37:227-231
- Vázquez AM (2001) Cryopreservation and genetic instability. *Plant Biosyst* 135:57-62
- Veilleux RE, Johnson AAT (1998) Somaclonal variation: Molecular analysis, transformation, interaction, and utilization. En: Janick J (ed) *Plant Breeding Reviews*, vol 16. John Wiley and Sons, Canada, 16:229-268
- Vicente MC, Fulton T (2003) Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity: DNA-based technologies. IPGRI, Cornell
- Volk GM, Caspersen AM (2007) Plasmolysis and recovery of different cell types in cryoprotected shoot tips of *Mentha x piperita*. *Protoplasma* 231:215-226
- von Aderkas PRP, Hristoforoglu K, Ma Y (2003) Embryogenesis and genetic stability in long term megagametophyte-derived cultures of larch. *Plant Cell Tiss Org Cult* 75:27-34
- von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 69:233-249
- von Arnold S (2008) Somatic embryogenesis. En: George EF, Hall MA, Klerk GJ (eds) *Plant Propagation by Tissue Culture* 3<sup>rd</sup> Edition. Springer, Dordrecht, pp 335-354
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23:4407-4414
- Vujović T, Sylvestre I, Ruzić D, Engelmann F (2011) Droplet-vitrification of apical shoot tips of *Rubus fruticosus* L. and *Prunus cerasifera* Ehrh. *Sci Hortic-Amsterdam* 130:222-228
- Wang XH, Lazzeri PA, Lörz H (1992) Chromosomal variation in dividing protoplasts derived from cell suspensions of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 85:181-185
- Wang ZY, Legris G, Nagel J, Potrykus I, Spangenberg G (1994) Cryopreservation of embryogenic cell suspensions in *Festuca* and *Lolium* species. *Plant Sci* 103:93-106
- Wang J-H, Ge J-G, Liu F, Bian H-W, Huang CN (1998) Cryopreservation of seeds and protocorms of *Dendrobium candidum*. *CryoLetters* 19:123-128
- Wang Q, Batuman O, Li P, Bar-Joseph M, Gafny R (2002a) A simple and efficient

- cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of 'Troyer' citrange (*Poncirus trifoliata* L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck) by encapsulation-vitrification. *Euphytica* 128:135-142
- Wang Q, Gafny R, Sahar N, Sela I, Mawassi M, Tanne E, Perl A (2002b) Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-dehydration and subsequent plant regeneration. *Plant Sci* 162:551-558
- Webster FB, Roberts DR, McInnis SM, Sutton BCS (1990) Propagation of interior spruce by somatic embryogenesis. *Can J Forest Res* 20(11):1759-1765
- Wen Y, Chunyan L, Xiuling B, Hengchun L, Li W (1999) Study on callus cryopreservation of *Freesia refracta* Klatt. *J Northeast Norm Univ* 4:70-72
- Widholm JM (1972) The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol* 47:189-194
- Wiesman Z, Avidan N, Lavee S, Quebedeaux B (1998) Molecular characterization of common olive varieties in Israel and the West Bank using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *J Am Soc Hortic Sci* 123:837-841
- Withers LA, Street HE (1977) Freeze preservation of cultured plant cells. III. The pregrowth phase. *Physiol Plantarum* 39:171-178
- Withers LA (1979) Freeze preservation of somatic embryos and clonal plantlets of carrot (*Daucus carota*). *Plant Physiol* 63:460-467
- Withers LA, Engelmann F (1998) *In vitro* conservation of plant genetic resources. En: Altman A (ed) *Biotechnology in agriculture*. Marcel Dekker Inc, New York, pp 57-88
- Williams EG, Maheswaran G (1986) Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Ann Bot-London* 57:443-462
- Williams ME, Hepburn AG, Widholm JM (1991) Somaclonal variation in a maize inbred line is not associated with changes in the number or location Ac-homologous sequences. *Theor Appl Genet* 81:272-276
- Wilkinson DG (1992) Whole mount in situ hybridization of vertebrate embryos. En: Wilkinson DG (ed) *In Situ Hybridisation: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp 74-83
- Wilkinson MJ, Bennett ST, Clulow SA, Allainguillaume J, Harding K, Bennett MD (1995) Evidence for somatic translocation during potato dihaploid induction. *Heredity* 74:146-151
- Wilkinson T, Wetten A, Fay MF (1998) Cryopreservation of *Cosmos atrosanguineus* shoot tips by a modified encapsulation/dehydration method. *CryoLetters* 19:293-302
- Wilkinson T, Andrew W, Prychid C, Fay MF (2003) Suitability of cryopreservation for the long term storage of rare and endangered plant species: a case history for *Cosmos atrosanguineus*. *Ann Bot-London* 91:65-74
- Winkelmann T, Mußmann V, Serek M (2004) Cryopreservation of embryogenic suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Cell Rep* 23:1-8
- Witjaksono, Litz RE (1999) Maturation of avocado somatic embryos and plant recovery. *Plant Cell Tiss Org Cult* 58:141-148
- Witjaksono, Litz RE, Pliego-Alfaro F (1999) Somatic embryogenesis of avocado (*Persea americana* Mill.). En: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants*, vol 5. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 197-214
- Wu SB, Collins G, Sedgley M (2004) A molecular linkage map of olive (*Olea europaea* L.) based on RAPD, microsatellite, and SCAR markers. *Genome* 47:26-35
- Wu Y-L, Huang X-L, Chen Q-Z, Li X-L, Engelmann F (2007) Induction and cryopreservation of embryogenic cultures from nucelli and immature cotyledon cuts of mango (*Mangifera indica* L. var. *Zihua*). *Plant cell Rep* 26:161-168
- Wu Y, Zhao Y, Engelmann F, Zhou M (2001) Cryopreservation of Kiwi shoot tips. *CryoLetters* 22:277-284
- Yang H, Tabei Y, Kamada H, Kayano T, Takaiwa F (1999) Detection of somaclonal variation in tissue cultured rice cells using digoxigenin-based random amplified polymorphic DNA.



- Plant Cell Rep 18:520-526
- Yin MH, Hong SR (2010) A simple cryopreservation protocol of *Dioscorea bulbifera* L. embryogenic calli by encapsulation-vitrification. Plant Cell Tiss Org Cult 101:349-358
- Yoon JW, Kim HH, Ko HC, Hwang HS, Hong ES, Cho EG, Engelmann F (2006) Cryopreservation of cultivated and wild potato varieties by droplet vitrification: Effect of subculture of mother-plants and of preculture of shoot tips. CryoLetters 27(4):211-222
- Zehr BE, Williams ME, Duncan RD, Widholm JM (1987) Somaclonal variation among the progeny of plants regenerated from callus cultures of seven inbred lines of maize. Can J Botany 65:491-499
- Zeng XH, Wen J, Wan ZJ, Yi B, Shen JX, Ma CZ, Tu JX, Fu TD (2010) Effect of bleomycin on microspore embryogenesis in *Brassica napus* and detection of somaclonal variation using AFLP molecular markers. Plant Cell Tiss Org Cult 101:23-29
- Zhai Z, Wu Y, Engelmann F, Chen R, Zhao Y (2003) Genetic stability assessment of plantlets regenerated from cryopreserved *in vitro* cultured grape and kiwi shoot tips using RAPD. CryoLetters 24:315-322
- Zhao Y, Wu Y, Engelmann F, Zhou M (2001) Cryopreservation of axillary buds of grape (*Vitis vinifera*) *in vitro* plantlets. CryoLetters 22: 321-328.
- Zimmerman MH, Brown CL (1980) Trees structure and function. Springer-Verlag, New York, p 336
- Zimmerman JL (1993) Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. Plant Cell 5:1411-1423
- Zohary D, Spiegel-Roy P (1975) Beginnings of fruit growing in the old world. Science 187:319-327
- Zohary D (1994) The wild genetic resources of the cultivated olive. Acta Hort 356:62-65